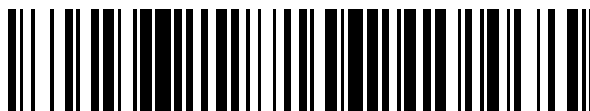


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 493**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2013 PCT/US2013/060653**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14047311**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2013 E 13773482 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2898086**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para prevenir la incorporación errónea de norleucina en proteínas**

30 Prioridad:

19.09.2012 US 201261703142 P
12.03.2013 US 201361777700 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2019

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel , CH

72 Inventor/es:

LAIRD, MICHAEL, W. y
VEERAVALLI, KARTHIK

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 705 493 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones para prevenir la incorporación errónea de norleucina en proteínas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para prevenir la incorporación errónea de norleucina en proteínas durante la producción de proteínas recombinantes en bacterias. La presente invención también proporciona células huésped de microorganismos y moléculas de ácido nucleico para su uso con los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento.

ANTECEDENTES

La norleucina, un análogo del aminoácido metionina, se puede incorporar erróneamente en proteínas en lugar de residuos de metionina. Cuando se expresan en *Escherichia coli* (*E. coli*), muchas proteínas heterólogas han incorporado erróneamente por equivocación norleucina en lugares donde deberían aparecer residuos de metionina. La incorporación errónea de norleucina en proteínas, en particular en proteínas heterólogas producidas por medios recombinantes, en general se considera indeseable debido, en parte, a la producción resultante de proteínas alteradas que tienen características indeseables.

Se ha observado incorporación errónea de norleucina en las posiciones de metionina durante la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* durante más de 50 años. (Véase, por ejemplo, Munier y Cohen (1959) Biochim Biophys Acta 31:378-391; Cohen y Munier (1956) Biochim Biophys Acta 21:592-593; Cohen y Munier (1959) Biochim Biophys Acta 31:347-356; y Cowie *et al.*, (1959) Biochim Biophys Acta 34:39-46). Por ejemplo, aproximadamente un 14 % de los residuos de metionina en la metionilsomatotropina bovina (MBS) presentaron incorporación errónea de norleucina durante la producción recombinante de esta proteína en *E. coli*, y también se sustituyeron aproximadamente un 6 % de los residuos de metionina en proteínas de *E. coli* naturales con norleucina. (Véase Bogosian *et al.*, (1989) J Biol Chem 264:531-9). En otro ejemplo, la producción de interleucina-2 en una fermentación de *E. coli* en medio mínimo dio como resultado que aproximadamente un 19 % de los residuos de metionina en la proteína recombinante se sustituyeron con norleucina. (Véase Tsai *et al.*, (1988) Biochem Biophys Res Commun 156:733-739). Otros estudios mostraron que se puede producir incorporación errónea de residuos de norleucina en la proteína tanto en residuos de metionina internos como en el residuo de metionina aminoterminal. (Véase Brown (1973) Biochim Biophys Acta 294:527-529; y Barker y Bruton (1979) J Mol Biol 133:217-231).

La norleucina compite con la metionina por su incorporación en proteínas debido a la naturaleza promiscua de la enzima metionil ARNt sintetasa (MetG). (Véase Trupin *et al.*, (1966) Biochem Biophys Res Commun 24:50-55; y Fersht y Dingwall (1979) Biochemistry 18:1250-1256). Los estudios cinéticos con la enzima MetG de *E. coli* mostraron que la acilación de MetG es aproximadamente 4 veces mayor con metionina en comparación con la de norleucina. (Véase van Hest *et al.*, (2000) Am Chem Soc 122:1282-1288). Debido a la relajada especificidad por sustrato de MetG, la norleucina puede sustituir a la metionina en la reacción de acilación, dando como resultado la incorporación errónea de norleucina en proteínas en lugar de metionina.

La incorporación errónea de residuos de norleucina en lugar de residuos de metionina en la producción de proteínas recombinantes en general se considera indeseable. Las proteínas o polipéptidos recombinantes que contienen residuos de norleucina incorporados erróneamente pueden presentar una alteración en las características estructurales y funcionales, tales como, por ejemplo, una alteración en la sensibilidad a la proteólisis, una disminución en la actividad biológica o un incremento en la inmunogenicidad.

Se han desarrollado diversas estrategias para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina durante la producción de proteínas recombinantes. Por ejemplo, se ha usado la complementación del medio de cultivo celular con metionina durante el proceso de fermentación (por alimentación/adición continua o en bolo de metionina) para garantizar que esté disponible metionina en exceso para las células, reduciendo así la probabilidad de una carga incorrecta del metionil ARNt con norleucina. (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.599.690). Aunque la alimentación/adición continua o en bolo de metionina redujo la extensión de la incorporación errónea de norleucina en proteínas recombinantes, la complejidad operativa y el coste del proceso de fermentación se pueden incrementar. Además, la alimentación/adición continua o en bolo de metionina durante la fermentación puede dar lugar a una dilución indeseable del contenido del fermentador, dando como resultado densidades celulares menores y rendimientos de producto menores.

También se ha usado la delección de genes implicados en la vía biosintética de norleucina tal como, por ejemplo, la delección de genes del operón de leucina (*leuA*, *leuB*, *leuC* y *leuD*) o la delección de genes que codifican transaminasas tales como *ilvE* o *tyrB*, para reducir la incorporación errónea de norleucina en proteínas. (Véase Bogosian *et al.*, (1989) J Biol Chem 264:531-539; Tsai *et al.*, (1989) Biochem Biophys Res Commun 156:733-739; y Randhawa *et al.*, (1994) Biochemistry 33:4352-4362). Sin embargo, la delección de genes de la vía biosintética para prevenir la incorporación errónea de norleucina puede requerir la adición de otros aminoácidos

(tales como leucina o isoleucina) al medio de cultivo durante la fermentación ya que muchos genes implicados en la biosíntesis de norleucina también están implicados en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada. (Véase Bogosian *et al.*, (1989) J Biol Chem 264:531-539; véase la figura 8 de la presente memoria descriptiva).

Otra estrategia usada para prevenir la incorporación errónea de norleucina implicó la coexpresión de enzimas que degradan la norleucina, incluyendo, por ejemplo, aminoácido deshidrogenasas y aminoácido oxidasas. Sin embargo, este enfoque requirió la sobreexpresión de estas enzimas, lo que puede no ser deseable durante la producción de proteínas recombinantes, y puede dar lugar a rendimientos de proteínas recombinantes menores. (Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US2007/0009995). Además, la sobreexpresión de estas enzimas puede dar como resultado la degradación de otros aminoácidos análogos durante el proceso de fermentación. También se realizó la alteración de la secuencia de aminoácidos primaria del polipéptido que se va a expresar sustituyendo codones de metionina con otros codones para prevenir la incorporación errónea de norleucina. (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.698.418). Sin embargo, dichas sustituciones pueden dar lugar a una disminución en la actividad o cambios estructurales en la proteína resultante, una consecuencia altamente indeseable para la producción de proteínas recombinantes en la industria de la biotecnología.

La patente de Estados Unidos n.º 7.371.551 divulga una cepa bacteriana que comprende una homoserina transsuccinilasa mutada en Y294C que tiene una reducción en la sensibilidad hacia L-metionina y retroinhibición de SAM. Sin embargo, esta referencia no divulga el uso de dicho mutante para la producción de una proteína o polipéptido sin incorporación errónea de norleucina. El documento WO89/07651 en general sugiere, sin datos, el uso de un huésped sobreproductor de metionina con el propósito de eliminar la incorporación de norleucina en la producción de proteínas.

Como se indica anteriormente, los procedimientos actuales usados para prevenir la incorporación errónea de norleucina durante la producción de proteínas recombinantes en microorganismos se asocian con diversas desventajas; por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos novedosos útiles para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en proteínas, en particular durante la producción de proteínas recombinantes en microorganismos, tales como *E. coli*.

La presente invención cumple esta necesidad proporcionando células huésped de microorganismos genomanipulados eficaces para prevenir la incorporación errónea de norleucina durante la producción de proteínas recombinantes en microorganismos, tales como, por ejemplo, bacterias. La presente invención proporciona, entre otros, células huésped de *E. coli* que comprenden los alelos *metA* y *metK* mutados (es decir, secuencias de ácido nucleico de *metA* y *metK* alteradas) que dan como resultado la producción de metionina por el microorganismo en un grado o extensión suficiente para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en proteínas y polipéptidos. El análisis de proteínas recombinantes producidas utilizando dichas células huésped mostró que se eliminó la incorporación errónea de residuos de norleucina en lugar de residuos de metionina. La presente invención demuestra además que el rendimiento del proceso de fermentación usando dichas células huésped de *E. coli*, incluyendo el crecimiento de las células huésped y los valores de los productos de proteínas recombinantes utilizando dichas células huésped de *E. coli*, fue comparable al observado en células huésped de control.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un procedimiento para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o el polipéptido en un microorganismo, en el que el microorganismo es un microorganismo mutante que produce metionina en un grado o extensión suficiente para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en la proteína o polipéptido, en el que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:24.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido expresado por un microorganismo, en los que el microorganismo produce metionina en un grado o extensión suficiente para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en la proteína o polipéptido. En algunos modos de realización, el microorganismo es un microorganismo con homoserina succiniltransferasa resistente a la autorregulación o insensible a la autorregulación. En otros modos de realización, el microorganismo es un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante, un alelo *metK* mutante o un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante, en los que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución aminoacídica en MetA seleccionada del grupo que consiste en una sustitución de arginina a cisteína en la posición aminoacídica 27, una sustitución de glutamina a ácido glutámico en la posición aminoacídica 64, una

sustitución de tirosina a cisteína en la posición aminoacídica 294, una sustitución de isoleucina a serina en la posición aminoacídica 296, y una sustitución de prolina a leucina en la posición aminoacídica 298. En algunos modos de realización, el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica sustituciones aminoacídicas en MetA que comprende una sustitución de isoleucina a serina en la posición aminoacídica 296 y una sustitución de prolina a leucina en la posición aminoacídica 298. Las posiciones aminoacídicas de MetA descritas en el presente documento en la presente memoria descriptiva se refieren a la secuencia de aminoácidos de MetA natural como se muestra en la figura 7A y SEQ ID NO:29.

En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante, en los que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26.

Como se establece anteriormente, la presente divulgación proporciona procedimientos para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido expresado por un microorganismo, en los que el microorganismo produce metionina en un grado o extensión suficiente para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en la proteína o polipéptido. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido expresado por un microorganismo, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en el microorganismo, en los que el microorganismo es un microorganismo desreprimido para la producción de metionina. En algunos modos de realización, el microorganismo está desreprimido para la producción de metionina debido a la pérdida de función parcial de la S-adenosilmetionina sintasa. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido expresado por un microorganismo, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en el microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metK* mutante. En algunos modos de realización, el alelo *metK* mutante da como resultado una pérdida de función parcial de MetK.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metK* mutante, en los que el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución aminoacídica en MetK que comprende una sustitución de valina a ácido glutámico en la posición aminoacídica 185. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metK* mutante, en los que el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una delección de la base citosina en la posición de residuo de ácido nucleico 1132 del alelo *metK*. Las posiciones aminoacídicas de MetK descritas en el presente documento en la presente memoria descriptiva se refieren a la secuencia de aminoácidos de MetK natural, como se muestra en la figura 8A y SEQ ID NO:30. Las posiciones de ácido nucleico de *metK* descritas en el presente documento en la presente memoria descriptiva se refieren a la secuencia de ácido nucleico de *metK* natural como se muestra en la figura 8B y SEQ ID NO:32.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metK* mutante, en los que el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28.

En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK*. En algunos modos de realización, el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución de tirosina por cisteína en la posición aminoacídica 294 de MetA y el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución de valina a ácido glutámico en la posición aminoacídica 185 de MetK. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK*, en los que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución de tirosina a cisteína en la posición aminoacídica 294 de MetA, y en los que el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una delección de la base citosina en la posición de residuo de ácido nucleico 1132 del alelo *metK*.

En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la

proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, y en los que el alelo *metA* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:24, y el alelo *metK* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:27. Aún en otros modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la

proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, en los que el alelo *metA* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:24, y el alelo *metK* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:28.

La presente divulgación proporciona además células huésped de microorganismos útiles para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en proteínas y polipéptidos expresados por una célula huésped de microorganismo. La presente divulgación también proporciona células huésped de microorganismos para su uso en la expresión de proteínas o polipéptidos por la célula huésped de microorganismo, en las que las proteínas o polipéptidos expresados no tienen incorporación errónea de norleucina. En algunos modos de realización, la célula huésped de microorganismo es una bacteria. En otros modos de realización, la célula huésped de microorganismo es *E. coli*.

La presente divulgación proporciona un microorganismo (por ejemplo, una célula huésped de microorganismo), en el que el microorganismo produce metionina en un grado o extensión suficiente para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en proteínas o polipéptidos expresados por el microorganismo. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo, en el que el microorganismo es un microorganismo con homoserina succiniltransferasa insensible a la autorregulación. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante, en el que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución aminoacídica en MetA seleccionada del grupo que consiste en una sustitución de arginina a cisteína en la posición aminoacídica 27, una sustitución de glutamina a ácido glutámico en la posición aminoacídica 64, una sustitución de tirosina a cisteína en la posición aminoacídica 294, una sustitución de isoleucina a serina en la posición aminoacídica 296 y una sustitución de prolina a leucina en la posición aminoacídica 298. En algunos modos de realización, la célula huésped de microorganismo es una bacteria. En otros modos de realización, la célula huésped de microorganismo es *E. coli*.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante, en el que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica más de una sustitución aminoacídica en MetA. En algunos modos de realización, el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución de isoleucina a serina en la posición aminoacídica 296 en MetA y una sustitución de prolina a leucina en la posición aminoacídica 298 en MetA. En algunos modos de realización, la célula huésped de microorganismo es una bacteria. En otros modos de realización, la célula huésped de microorganismo es *E. coli*.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo, en el que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante, en el que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26. En algunos modos de realización, la célula huésped de microorganismo es una bacteria. En otros modos de realización, la célula huésped de microorganismo es *E. coli*.

La presente divulgación proporciona un microorganismo (por ejemplo, una célula huésped de microorganismo), en el que el microorganismo produce metionina en un grado o extensión suficiente para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en proteínas o polipéptidos expresados por el microorganismo.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo, en el que el microorganismo es un microorganismo desreprimido para la producción de metionina. En algunos aspectos, el microorganismo desreprimido para la producción de metionina resulta de una pérdida de función parcial de la S-adenosilmetionina sintasa. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metK* mutante. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metK* mutante, en el que el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución aminoacídica en MetK que comprende una sustitución de valina a ácido glutámico en la posición aminoacídica 185. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metK* mutante, en el que el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una delección de la base citosina en la posición de residuo de ácido nucleico 1132 en el alelo *metK*. En algunos modos de realización, la célula huésped de microorganismo es una bacteria. En otros modos de realización, la célula huésped de microorganismo es *E. coli*.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo, en el que el microorganismo comprende un alelo *metK* mutante, en el que el alelo *metK* mutante comprende una secuencia

de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28. En algunos modos de realización, la célula huésped de microorganismo es una bacteria. En otros modos de realización, la célula huésped de microorganismo es *E. coli*.

La presente divulgación también proporciona células huésped de microorganismos que comprenden diversas combinaciones de alelos *metA* mutantes y alelos *metK* mutantes. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, en el que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución aminoacídica en MetA que comprende una sustitución de tirosina a cisteína en la posición aminoacídica 294, y en el que el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución aminoacídica en MetK que comprende una sustitución de valina a ácido glutámico en la posición aminoacídica 185. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, en el que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución aminoacídica en MetA que comprende una sustitución de tirosina a cisteína en la posición aminoacídica 294, y en el que el alelo *metK* mutante comprende una delección de la citosina de ácido nucleico en el residuo de ácido nucleico 1132 del alelo *metK*. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo, en el que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, en el que el alelo *metA* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:24, y en el que el alelo *metK* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:27. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo, en el que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, en el que el alelo *metA* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:24, y en el que el alelo *metK* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:28. En algunos modos de realización, la célula huésped de microorganismo es una bacteria. En otros modos de realización, la célula huésped de microorganismo es *E. coli*.

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas para su uso en los presentes procedimientos. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico de *metA* aisladas (es decir, moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican MetA). En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico de *metA* aislada, en la que la molécula de ácido nucleico de *metA* comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución aminoacídica en MetA seleccionada del grupo que consiste en una sustitución de arginina a cisteína en la posición aminoacídica 27, una sustitución de glutamina a ácido glutámico en la posición aminoacídica 64, una sustitución de tirosina a cisteína en la posición aminoacídica 294, una sustitución de isoleucina a serina en la posición aminoacídica 296 y una sustitución de prolina a leucina en la posición aminoacídica 298. En otros modos de realización, una molécula de ácido nucleico de *metA* aislada proporcionada por la presente divulgación comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26. El uso de estas moléculas de ácido nucleico de *metA* aisladas y secuencias de las mismas para la producción de microorganismos para su uso en prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en proteínas o polipéptidos se proporciona específicamente en el presente documento por la presente divulgación.

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico de *metK* aisladas (es decir, moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican MetK). En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico de *metK*, en la que la molécula de ácido nucleico de *metK* comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustitución aminoacídica en MetK que comprende una sustitución de valina a ácido glutámico en la posición aminoacídica 185. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico de *metK*, en la que la molécula de ácido nucleico de *metK* comprende una delección de la citosina de ácido nucleico en el residuo de ácido nucleico 1132 del alelo *metK*. En otros modos de realización, una molécula de ácido nucleico de *metK* proporcionada por la presente divulgación comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28. El uso de estas moléculas de ácido nucleico de *metK* aisladas y secuencias de las mismas para la producción de microorganismos para su uso en prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en proteínas o polipéptidos se proporciona específicamente en el presente documento por la presente divulgación.

La presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un ácido nucleico que comprende un alelo *metA* mutante, en el que el microorganismo comprende además un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de anticuerpo anti-VEGF. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un ácido nucleico que comprende un alelo *metA* mutante, en el que el microorganismo comprende además un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47. En algunos modos de realización, el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 es la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:33. En algunos modos de realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 es la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:34. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un ácido nucleico que comprende un alelo *metA* mutante, en el que el microorganismo comprende

comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, en el que el microorganismo comprende además un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48 y un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49. En algunos modos de realización, el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26, y el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28. En algunos aspectos, el microorganismo es una bacteria, por ejemplo, *E. coli*.

La presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un ácido nucleico que comprende un alelo *metA* mutante, en el que el microorganismo comprende además un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-MET o un fragmento de anticuerpo anti-MET. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un ácido nucleico que comprende un alelo *metA* mutante, en el que el microorganismo comprende además un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, y un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52. En algunos modos de realización, el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26. En algunos aspectos, el microorganismo es una bacteria, por ejemplo, *E. coli*.

La presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un ácido nucleico que comprende un alelo *metK* mutante, en el que el microorganismo comprende además un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-MET o un fragmento de anticuerpo anti-MET. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un ácido nucleico que comprende un alelo *metK* mutante, en el que el microorganismo comprende además un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, y un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52. En algunos modos de realización, el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28. En algunos aspectos, el microorganismo es una bacteria, por ejemplo, *E. coli*.

La presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un ácido nucleico que comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, en el que el microorganismo comprende además un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-MET o un fragmento de anticuerpo anti-MET. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un ácido nucleico que comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, en el que el microorganismo comprende además un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, y un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52. En algunos modos de realización, el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26, y el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28. En algunos aspectos, el microorganismo es una bacteria, por ejemplo, *E. coli*.

La presente invención proporciona además un procedimiento para producir una proteína o un polipéptido sin incorporación errónea de norleucina en una célula huésped bacteriana, en el que la proteína o el polipéptido no tiene incorporación errónea de norleucina, comprendiendo el procedimiento expresar en la célula huésped bacteriana un ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido en condiciones de cultivo adecuadas para permitir la expresión de la proteína o el polipéptido, en el que la célula huésped bacteriana comprende un alelo *metA* mutante que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:24.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo en una célula huésped bacteriana, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo no tiene incorporación errónea de norleucina, comprendiendo el procedimiento expresar en la célula huésped bacteriana un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en el que la célula huésped bacteriana comprende un alelo *metA* mutante, un alelo *metK* mutante, o un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, produciendo de este modo un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo sin incorporación errónea de norleucina. En algunos aspectos, el procedimiento para producir un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo en una célula huésped bacteriana sin incorporación errónea de norleucina de acuerdo con la presente divulgación comprende expresar en la célula huésped bacteriana un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo y un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadena ligera de anticuerpo. En algunos aspectos, el polipéptido de cadena pesada de anticuerpo es un polipéptido de cadena pesada de fragmento Fab de anticuerpo, y el polipéptido de cadena ligera de anticuerpo es un polipéptido de cadena ligera de fragmento Fab de anticuerpo. En algunos modos de realización, el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26, y el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de anticuerpo anti-VEGF en una célula huésped bacteriana, en el que el anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de anticuerpo anti-VEGF no tiene incorporación errónea de norleucina, comprendiendo el procedimiento expresar en la célula huésped bacteriana un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-VEGF o el fragmento del anticuerpo anti-VEGF, en el que la célula huésped bacteriana comprende un alelo *metA* mutante, un alelo *metK* mutante o un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, produciendo de este modo un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de anticuerpo anti-VEGF sin incorporación errónea de norleucina. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende expresar en la célula huésped bacteriana un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo anti-VEGF o un polipéptido de cadena pesada de fragmento de anticuerpo anti-VEGF o fragmento del mismo y un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadena ligera de anticuerpo anti-VEGF o un polipéptido de cadena ligera de fragmento de anticuerpo anti-VEGF o fragmento del mismo. En algunos aspectos, la cadena pesada de anticuerpo anti-VEGF y la cadena ligera de anticuerpo anti-VEGF son polipéptidos de anticuerpo anti-VEGF de cadena pesada y cadena ligera de longitud completa. En otros aspectos, la cadena pesada de anticuerpo anti-VEGF es un polipéptido de cadena pesada de fragmento Fab de anticuerpo, y la cadena ligera de anticuerpo anti-VEGF es un polipéptido de cadena ligera de fragmento Fab de anticuerpo. En algunos modos de realización, la cadena pesada de anticuerpo anti-VEGF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y la cadena ligera de anticuerpo anti-VEGF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46. En algunos modos de realización, el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 es la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:34. En algunos modos de realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 es la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:33. En algunos modos de realización, el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26. En algunos modos de realización, el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28.

La divulgación proporciona además un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de anticuerpo anti-VEGF producido por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, en el que el anticuerpo anti-VEGF o fragmento de anticuerpo anti-VEGF no tiene incorporación errónea de norleucina.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo anti-factor D o un fragmento de anticuerpo anti-factor D en una célula huésped bacteriana, en el que el anticuerpo anti-factor D o el fragmento de anticuerpo anti-factor D no tiene incorporación errónea de norleucina, comprendiendo el procedimiento expresar en la célula huésped bacteriana un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-factor D o el fragmento del anticuerpo anti-factor D, en el que la célula huésped bacteriana comprende un alelo *metA* mutante, un alelo *metK* mutante o un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, produciendo de este modo un anticuerpo anti-factor D o un fragmento de anticuerpo anti-factor D sin incorporación errónea de norleucina. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende expresar en la célula huésped bacteriana un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo anti-factor D o un polipéptido de cadena pesada de fragmento de anticuerpo anti-factor D o fragmento del mismo y un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadena ligera de anticuerpo anti-factor D o un polipéptido de cadena ligera de fragmento de anticuerpo anti-factor D o fragmento del mismo. En algunos aspectos, la cadena pesada de anticuerpo anti-factor D y la cadena ligera de anticuerpo anti-factor D son polipéptidos de anticuerpo anti-factor D de cadena pesada y cadena ligera de longitud completa. En otros aspectos, la cadena pesada de anticuerpo anti-factor D es un polipéptido de cadena pesada de fragmento Fab de anticuerpo, y la cadena ligera de anticuerpo anti-factor D es un polipéptido de cadena ligera de fragmento Fab de anticuerpo. En algunos modos de realización, la cadena pesada de anticuerpo anti-Factor D comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y la cadena ligera de anticuerpo anti-Factor D comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48. En algunos modos de realización, el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26. En algunos modos de realización, el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28.

La divulgación proporciona además un anticuerpo anti-factor D o fragmento de anticuerpo anti-factor D producido por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, en el que el anticuerpo anti-factor D o fragmento de anticuerpo anti-factor D no tiene incorporación errónea de norleucina.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo anti-MET o un fragmento de anticuerpo anti-MET en una célula huésped bacteriana, en el que el anticuerpo anti-MET o el fragmento de anticuerpo anti-MET no tiene incorporación errónea de norleucina, comprendiendo el procedimiento expresar en la célula huésped bacteriana un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-MET o el fragmento del anticuerpo anti-MET, en el que la célula huésped bacteriana comprende un alelo *metA* mutante, un alelo *metK* mutante o un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, produciendo de este modo un anticuerpo anti-MET o un fragmento de anticuerpo anti-MET sin incorporación errónea de norleucina. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende expresar en la célula huésped bacteriana un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo anti-MET o un

polipéptido de cadena pesada de fragmento de anticuerpo anti-MET o fragmento del mismo y un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadena ligera de anticuerpo anti-MET o un polipéptido de cadena ligera de fragmento de anticuerpo anti-MET o fragmento del mismo. En algunos aspectos, la cadena pesada de anticuerpo anti-MET y la cadena ligera de anticuerpo anti-MET son polipéptidos de anticuerpo anti-MET de cadena pesada y cadena ligera de longitud completa. En otros aspectos, la cadena pesada de anticuerpo anti-MET es un polipéptido de cadena pesada de fragmento Fab de anticuerpo, y la cadena ligera de anticuerpo anti-MET es un polipéptido de cadena ligera de fragmento Fab de anticuerpo. En algunos modos de realización, la cadena pesada de anticuerpo anti-MET comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, el fragmento de cadena pesada de anticuerpo anti-MET comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52 y la cadena ligera de anticuerpo anti-MET comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50. En algunos modos de realización, el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26. En algunos modos de realización, el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28.

La divulgación proporciona además un anticuerpo anti-MET o fragmento de anticuerpo anti-MET producido por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, en el que el anticuerpo anti-MET o fragmento de anticuerpo anti-MET no tiene incorporación errónea de norleucina.

En diversos aspectos, un microorganismo mutante que comprende una cualquiera o más de las secuencias de ácido nucleico proporcionadas por la presente divulgación es una bacteria; en otros aspectos, el microorganismo es *E. coli*. La presente divulgación proporciona específicamente el uso de un microorganismo mutante descrito en el presente documento para la producción de polipéptidos heterólogos (por ejemplo, recombinantes) y proteínas heterólogas (por ejemplo, recombinantes), en el que la incorporación errónea de norleucina en los polipéptidos heterólogos y proteínas heterólogas se reduce, se reduce sustancialmente, se elimina sustancialmente, o se previene.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la secuencia de ácido nucleico de *metA*(R27C) correspondiente a SEQ ID NO:23.

La figura 2 muestra la secuencia de ácido nucleico de *metA*(Y294C) correspondiente a SEQ ID NO:24.

La figura 3 muestra la secuencia de ácido nucleico de *metA*(I296S/P298L) correspondiente a SEQ ID NO:25.

La figura 4 muestra la secuencia de ácido nucleico de *metA*(Q64E) correspondiente a SEQ ID NO:26.

La figura 5 muestra la secuencia de ácido nucleico de *metK*(V185E) correspondiente a SEQ ID NO:27.

La figura 6 muestra la secuencia de ácido nucleico de *metK*(c1132del) correspondiente a SEQ ID NO:28.

Las figuras 7A y 7B muestran la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico de MetA natural correspondientes a SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:31, respectivamente.

Las figuras 8A y 8B muestran la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico de MetK natural correspondientes a SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:32, respectivamente.

La figura 9 muestra la estructura de norleucina y análogos de norleucina. La norleucina es un análogo estructural de metionina, donde el átomo de azufre (S) se reemplaza por un grupo metileno (es decir, $-\text{CH}_2$).

La figura 10 muestra un esquema de la vía biosintética de norleucina en *E. coli*. Las flechas discontinuas indican que están implicadas múltiples etapas. Se convierte el piruvato en α -cetocaproato por tres pasos a través del procedimiento de alargamiento de la cadena de ceto-ácido catalizado por enzimas codificadas por el operón de leucina *leuABCD*. Se transamina el intermedio α -cetocaproato a norleucina por las transaminasas IlvE o TyrB.

La figura 11 muestra la biosíntesis y regulación de metionina en *E. coli*. Las flechas discontinuas indican la retroinhibición y las flechas continuas indican la represión. La metionina y la S-adenosilmetionina (SAM) son retroinhibidores de la enzima MetA. El represor MetJ y su correpresor SAM inhiben la transcripción de enzimas en el regulón de metionina.

Las figuras 12A, 12B y 12C exponen tendencias de crecimiento, como se mide por DO_{550} (figura 12A) y DO_{i550} (figura 12B) de 10 l de fermentaciones de *E. coli*. Se ejecutó la fermentación del huésped de control (60E4) con una alimentación de metionina continua (■) o de agua continua (□) (figura 12A).

Se realizó la fermentación del huésped 60E4 *metA*(Y294C) con alimentación de agua continua (Δ) o sin alimentación (▲) (figura 12A). La figura 12C muestra tendencias de crecimiento para el huésped de control 60E4

sin alimentación (cuadrados), para el huésped de control 60E4 con alimentación de metionina (círculos) y huésped 60E4 *metA*(Y294C) sin alimentación (triángulos). Se realizaron fermentaciones usando todos los otros mutantes con alimentación de agua continua.

Las figuras 13A y 13B muestran niveles de metionina extracelular (figura 13A) e intracelular (figura 13B) para fermentaciones del huésped de control (□) y células huésped de 60E4 *metA*(Y294C) (Δ) realizadas con alimentación de agua continua. Los niveles de fosfato en el medio extracelular también se muestran en gráficos de líneas discontinuas (figura 13A) y (figura 13B) para fermentaciones de células huésped de control (□) y células huésped de 60A4 *metA*(Y294C) (Δ) realizadas con alimentación de agua continua.

Las figuras 14A y 14B muestran niveles de metionina extracelular (figura 14A) e intracelular (figura 14B) para cepas de células huésped mutantes de la presente divulgación. Los niveles de metionina extracelular e intracelular también se muestran para dos fermentaciones de células huésped de control realizadas con metionina continua (■) o alimentación de agua continua (□), respectivamente.

La figura 15 muestra los niveles de fosfato extracelular durante las fermentaciones.

Las figuras 16A y 16B muestran el valor final (figura 16A) y el valor de evolución temporal (figura 16B) de fermentaciones de células huésped de *E. coli*. Se realizó la fermentación de células huésped de control (60E4) se realizó con alimentación de metionina continua (■) o de agua continua (□). Se realizó la fermentación de células huésped de 60E4 *metA* (Y294C) con una alimentación de agua continua (Δ) o sin alimentación (▲). Se realizaron fermentaciones usando las otras células huésped mutantes con alimentación de agua continua.

Las figuras 17A y 17B exponen los resultados de inmunoelctrotransferencias realizadas en muestras de caldo celular completo obtenidas durante las fermentaciones de células huésped de 60E4 (célula huésped de control) y de células huésped de 60A4 *metA* (Y294C), respectivamente.

Las figuras 18A y 18B muestran las secuencias de ácido nucleico de una cadena ligera y cadena pesada de fragmento Fab de anticuerpo anti-factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF) correspondientes a SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34, respectivamente.

Las figuras 19A y 19B exponen tendencias de crecimiento de 10 l de fermentaciones de *E. coli*, como se mide por DO₅₅₀. Se ejecutaron los procedimientos de fermentación de huéspedes de control (66F8 o 64B4) AF2 o AF3, respectivamente, sin alimentación (cuadrados) o con metionina continua (círculos). Se realizaron las fermentaciones de los huéspedes 66F8 *metA*(Y294C) y 64B4 *metA*(Y294C) sin alimentación (triángulos).

Las figuras 20A, 20B y 20C exponen los rendimientos de productos de proteínas recombinantes usando las cepas de huésped 60E4 (huésped de control) y 60E4 *metA*(Y294C), 66F8 (huésped de control) y 66F8 *metA*(Y294C) y 64B4 (huésped de control) y 64B4 *metA*(Y294C), respectivamente.

Las figuras 21A y 21B muestran las secuencias de aminoácidos de una cadena ligera y cadena pesada de fragmento Fab de anticuerpo anti-factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF) correspondientes a SEQ ID NO:46 y SEQ ID NO:47, respectivamente.

Las figuras 22A y 22B muestran las secuencias de aminoácidos de una cadena ligera y cadena pesada de fragmento Fab de anticuerpo anti-factor D correspondientes a SEQ ID NO:48 y SEQ ID NO:49, respectivamente.

Las figuras 23A, 23B y 23C muestran las secuencias de aminoácidos de una cadena ligera (SEQ ID NO:50), cadena pesada (SEQ ID NO:51) y fragmento de cadena pesada (SEQ ID NO:52) de anticuerpo anti-MET.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente divulgación proporciona, entre otros, procedimientos y composiciones para prevenir la incorporación errónea de norleucina en proteínas y polipéptidos, en particular durante la producción de proteínas recombinantes en microorganismos. La presente divulgación también proporciona células huésped de microorganismos y moléculas de ácido nucleico para su uso en los procedimientos de la divulgación.

Procedimientos generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, bioquímica e inmunología, que son conocidas y están disponibles para un experto en la técnica. Dichas técnicas se describen en la literatura, tales como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición (Sambrook et al., 2001) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (P. Herdewijn, ed., 2004); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: *The Polymerase Chain Reaction* (Mullis et al., eds., 1994);

Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); y *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999). La expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*).

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención.

Definiciones

Los términos "proteína heteróloga" o "polipéptido heterólogo" se refieren a una proteína o un polipéptido no sintetizado o producido naturalmente por una célula u organismo (por ejemplo, un microorganismo) de interés. Por ejemplo, una célula de *E. coli* puede producir una proteína humana o un polipéptido humano, y una proteína humana o un polipéptido humano así producido es una proteína heteróloga o un polipéptido heterólogo. De particular interés en el contexto de la presente invención son las proteínas heterólogas o polipéptidos heterólogos que comprenden metionina. Una proteína heteróloga o un polipéptido heterólogo como se usa en el presente documento también se refiere a una proteína recombinante o un polipéptido recombinante.

El término "incorporación errónea de norleucina" se refiere a la incorporación de un residuo de norleucina en una proteína o polipéptido para el que un residuo de metionina se codifica por el ácido nucleico correspondiente que codifica la proteína o polipéptido.

Los términos "alelo mutante" o "alelo mutado" se refieren a un alelo que tiene una secuencia de ácido nucleico que es diferente de o está alterada de la secuencia de ácido nucleico del alelo natural (es decir, como se encuentra naturalmente dentro de la célula o microorganismo de interés).

Los términos "microorganismo mutante" o "microorganismo mutado" se refieren a un microorganismo que contiene uno o más alelos mutantes o alelos mutados.

La expresión "sustancialmente reducida" o "sustancialmente diferente", como se usa en el presente documento, se refiere a un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (en general, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, contenido en norleucina en una proteína o polipéptido).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

"Molécula de ácido nucleico *metA* aislada" o "molécula de ácido nucleico *metK* aislada" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican MetA o MetK, respectivamente, incluyendo dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped. "Molécula de ácido nucleico de *metA* aislada" o molécula de ácido nucleico de *metK* aislada" también se refiere a un alelo *metA* mutante o un alelo *metK* mutante.

La expresión "proteína o polipéptido sin incorporación errónea de norleucina" se refiere a una proteína o polipéptido que no contiene niveles detectables de residuos de norleucina.

Como se usa en el presente documento, la forma singular de "un", "una" y "el/la" incluye las referencias de plural a menos que se indique de otro modo.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) aspectos que se refieren a ese valor o parámetro, *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Procedimientos para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina

La presente divulgación se refiere, en parte, a procedimientos y composiciones útiles para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en proteínas y polipéptidos, en particular durante la producción de proteínas recombinantes en microorganismos.

5 La incorporación errónea de residuos de norleucina en lugar de residuos de metionina durante la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* se ha descrito anteriormente. Un enfoque usado actualmente para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina es por la alimentación continua o en bolo de metionina al medio de cultivo durante el proceso de fermentación. Aunque esta estrategia es eficaz para reducir la incorporación errónea de norleucina, se asocian varias desventajas operativas con la alimentación o adición continua o en bolo de metionina durante el proceso de fermentación. Por ejemplo, la alimentación continua o en bolo al cultivo incrementa la complejidad operativa y el coste global del proceso de fermentación. Además, la alimentación de metionina da lugar a una dilución indeseable del medio de fermentación dando como resultado densidades celulares menores y posiblemente rendimientos de producto menores.

15 Para superar estas desventajas, los autores de la presente invención han proporcionado una alternativa a la alimentación de metionina continua o en bolo para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en la producción de proteínas o polipéptidos heterólogos. En particular, la presente divulgación proporciona células huésped de microorganismo (por ejemplo, *E. coli*) diseñadas para producir metionina en un grado o extensión suficiente para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina durante la producción de proteínas recombinantes, incluyendo la producción de proteínas recombinantes realizada a densidades de células huésped altas.

25 Previamente se informó de mutantes de células huésped de *E. coli* útiles para la producción de metionina a gran escala. (Véase, por ejemplo, Chattopadhyay *et al.*, (1991) J Gen Microbiol 137:685-691; Nakamori *et al.*, (1999) Appl Microbiol Biotechnol 52:179-185; Usuda y Kurahashi (2005) Appl Environ Microbiol 71:3228-3234; publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2005/111202 2005; y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US2009/0298135). Muchas de estas cepas de *E. coli* mutantes contenían mutaciones en tres genes asociados con la regulación de la biosíntesis de metionina: *metJ*, *metA* y *metK*.

30 La regulación transcripcional de la biosíntesis de metionina en *E. coli* implica la enzima MetJ (producto génico *metJ*). MetJ es un represor transcripcional que, cuando se une a su correpresor S-adenosilmetionina (SAM), reprime la transcripción de genes en el regulón de metionina, regulando así los niveles de metionina en la célula. (Véase, por ejemplo, Marines (2006) *et al.*, Biochem J 396:227-234). Como se informa previamente, la mutagénesis química de *E. coli* seguida de la selección del crecimiento en etionina (un análogo de metionina tóxico) dio lugar al aislamiento de una mutación de serina a asparagina en la posición aminoacídica 54 (S54N) en MetJ, lo que dio como resultado la desrepresión de enzimas biosintéticas de metionina y el incremento en la producción de metionina. (Véase Nakamori *et al.*, (1999) Appl Microbiol Biotechnol 52:179-185). Una inactivación completa del gen *metJ* también dio como resultado la desrepresión de las enzimas implicadas en la vía biosintética de metionina y la sobreproducción de metionina. (Véase Usuda y Kurahashi (2005) Appl Environ Microbiol 71:3228-3234).

45 La biosíntesis de metionina en *E. coli* también se regula por la retroinhibición (por metionina y SAM) de la homoserina succiniltransferasa (producto génico *metA*), la enzima implicada en la primera etapa de la biosíntesis de metionina. (Véase, por ejemplo, Born y Blanchard (1999) Biochemistry 38:14416-14423). Se aislaron previamente mutantes de MetA (producto génico *metA*) resistentes a la autorregulación en *E. coli* que dan lugar a la desregulación de la biosíntesis de metionina seleccionando el crecimiento en el análogo de metionina tóxico α -metilmetionina. (Véase Usuda y Kurahashi (2005) Appl Environ Microbiol 71:3228-3234; y publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2005/111202).

50 El gen *metK* codifica la enzima S-adenosilmetionina sintasa, que convierte metionina en S-adenosilmetionina. (Véase Markham *et al.*, (1980) J Biol Chem 255:9082-9092). Se aislaron previamente mutantes de MetK con pérdida de función parcial que da como resultado niveles bajos de SAM y por tanto desrepresión de las enzimas biosintéticas de metionina (SAM es un correpresor para MetJ) seleccionando el crecimiento en los análogos de metionina tóxicos, norleucina y etionina. (Véase Chattopadhyay *et al.*, (1991) Gen Microbiol 137:685-691; Usuda y Kurahashi (2005) Appl Environ Microbiol 71:3228-3234; y publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2005/111202).

60 En la presente divulgación, se mutaron residuos de ácido nucleico específicos en el gen *metA* natural, dando como resultado las siguientes sustituciones aminoacídicas en MetA (véase la figura 7A y SEQ ID NO:29 para la secuencia de aminoácidos de MetA natural): sustitución de arginina a cisteína en la posición aminoacídica 27 (R27C); sustitución de glutamina a ácido glutámico en la posición aminoacídica 64 (Q64E); sustitución de tirosina a cisteína en la posición aminoacídica 294 (Y294C); sustitución de isoleucina a serina en la posición aminoacídica 296 (I296S); y sustitución de prolina a leucina en la posición aminoacídica 298 (P298L). Las células huésped de *E. coli* que comprenden una o más de estas sustituciones aminoacídicas de MetA produjeron metionina en un grado o extensión suficiente para dar como resultado la prevención de la incorporación errónea de norleucina en proteínas heterólogas expresadas.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona diversos alelos *metA* mutantes que codifican las sustituciones aminoacídicas en MetA de R27C, Q64E, Y294C, I296S y P298L (en comparación con la secuencia de aminoácidos de MetA natural; figura 7 y SEQ ID NO:29). Dichos alelos *metA* mutantes dieron como resultado una enzima MetA resistente a la autorregulación. Los alelos *metA* mutantes se introdujeron en células huésped de *E. coli* (60E4) usando un procedimiento de intercambio alélico (véase Materiales y procedimientos a continuación) para obtener la cepa de célula huésped de *E. coli* mutante 66H6 (60E4 *metA*(R27C)), 66H8 (60E4 *metA*(Y294C)), 67B8 (60E4 *metA*(Q64E)) y 67B9 (60E4 *metA*(I296S P298L)). Las células huésped de *E. coli* mutantes resultantes obtenidas se evaluaron para determinar la incorporación errónea de norleucina durante la producción de proteínas recombinantes realizada sin una alimentación continua de metionina. (Véase el ejemplo 4 a continuación).

Todas las referencias a las posiciones aminoacídicas en MetA se hacen en base a la homoserina succiniltransferasa codificada por el gen *metA* de *E. coli* mostradas en las figuras 7A y 7B, correspondientes a SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:31. Se hace referencia a las posiciones aminoacídicas contando el primer aminoácido de metionina como la posición aminoacídica número 1. Las posiciones relativas de regiones correspondientes en las enzimas homoserina succiniltransferasas de otros organismos se pueden identificar por un experto en la técnica, por ejemplo, por simple alineación de secuencias.

En la presente divulgación, se mutó un ácido nucleico en el gen *metK* natural, dando como resultado la sustitución aminoacídica en MetK de valina a ácido glutámico en la posición aminoacídica 185 (V185E)). (Véanse la figura 8A y SEQ ID NO:30 para secuencia de aminoácidos de MetK natural.) Adicionalmente, se eliminó un ácido nucleico específico en la posición de base citosina 1132 en el gen *metK* (c1132del). Las células huésped de *E. coli* que comprenden uno o más de estos alelos *metK* mutantes produjeron metionina en un grado o extensión suficiente para dar como resultado la prevención de la incorporación errónea de norleucina en proteínas heterólogas expresadas.

En algunos modos de realización, la presente divulgación también proporciona diversos alelos *MetK* mutantes que codifican la sustitución aminoacídica V185E o una delección de la base citosina en la posición 1132 en el alelo *metK* (c1132del). Dichos alelos *metK* mutantes dan como resultado enzimas MetK con pérdida de función parcial. Se introdujeron alelos *metK* mutantes en diversas células huésped de *E. coli* (66H8; 60E4 *metA*(Y294C), véase anteriormente) usando un procedimiento de intercambio alélico (véase Materiales y procedimientos a continuación) para obtener las cepas de células huésped de *E. coli* 67C2 (66H8 *metK*(V185E)) y 67C3 (66H8 *metK*(c1132del)), respectivamente. Las células huésped de *E. coli* mutantes resultantes obtenidas se evaluaron para determinar la incorporación errónea de norleucina durante la producción de proteínas recombinantes realizada sin una alimentación continua de metionina. (Véase el ejemplo 4 a continuación).

Todas las referencias a las posiciones aminoacídicas en MetK se hacen en base a la S-adenosilmetionina sintasa codificada por el gen *metK* de *E. coli* mostrado en las figuras 8A y 8B, correspondiente a SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:32. Se hace referencia a las posiciones aminoacídicas contando el primer aminoácido de metionina como la posición aminoacídica número 1. Las posiciones relativas de regiones correspondientes en las enzimas S-adenosilmetionina sintasas de otros organismos se pueden identificar por un experto en la técnica, por ejemplo, por simple alineación de secuencias.

Moléculas de ácido nucleico para *metA* y *metK*

A modo de ejemplo, la presente divulgación usó moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden secuencias de ácido nucleico de *metA* y *metK* que difieren de las secuencias de ácido nucleico de *metA* y *metK* naturales. Las secuencias de ácido nucleico de *metA* y *metK* proporcionadas por la presente divulgación codifican diversas sustituciones aminoacídicas a las codificadas por *metA* natural (arginina en la posición aminoacídica 27 reemplazada por cisteína (R27C); glutamina en la posición aminoacídica 64 reemplazada por ácido glutámico (Q64E); tirosina en la posición aminoacídica 294 reemplazada por cisteína (Y294C); isoleucina en la posición aminoacídica 296 reemplazada por serina (I296S); prolina en la posición aminoacídica 298 reemplazada por leucina (P298L); e isoleucina en la posición aminoacídica 296 reemplazada por serina (I296S) y prolina en la posición aminoacídica 298 reemplazada por leucina (P298L)); y a las codificadas por *metK* natural (valina en la posición aminoacídica 185 reemplazada por ácido glutámico (V185E) y secuencias de ácido nucleico que comprenden una delección de la base citosina en la posición 1132 (c1132del)). El uso de cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica un alelo *metA* o un alelo *metK* que da como resultado estas sustituciones aminoacídicas se contempla específicamente en el presente documento para su uso en los procedimientos de la presente divulgación.

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico de *metA* aisladas que codifican diversas enzimas MetA alteradas (es decir, que codifican diversas enzimas homoserina succiniltransferasas mutantes). En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada, en la que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26.

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico de *metK* aisladas que codifican diversas enzimas MetK alteradas (es decir, que codifican diversas enzimas S-adenosilmetionina mutantes). En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada, en la que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28.

La presente divulgación también proporciona, a modo de ejemplo, diversas combinaciones de alelos *metA* mutantes y moléculas de ácido nucleico aisladas correspondientes que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican las siguientes sustituciones aminoacídicas en MetA: arginina en la posición aminoacídica 27 sustituida con cisteína (R27C); glutamina en la posición aminoacídica 64 sustituida con ácido glutámico (Q64E); tirosina en la posición aminoacídica 294 sustituida con cisteína (Y294C); isoleucina en la posición aminoacídica 296 sustituida con serina (I296S); prolina en la posición aminoacídica 298 reemplazada por leucina (P298L); e isoleucina en la posición aminoacídica 296 sustituida con serina (I296S) y prolina en la posición aminoacídica 298 sustituida con leucina (P298L). En algunos aspectos, los alelos *metA* mutantes proporcionados por la presente divulgación dan como resultado enzimas MetA resistentes a la autorregulación (es decir, insensibles a la autorregulación). Las posiciones aminoacídicas se refieren a la secuencia de aminoácidos de MetA natural como se muestra en la figura 7A y SEQ ID NO:29.

También se proporciona por la presente divulgación, a modo de ejemplo, diversas combinaciones de alelos *metK* mutantes y moléculas de ácido nucleico aisladas correspondientes que comprenden la secuencia de ácido nucleico que codifica la siguiente sustitución aminoacídica en MetK: valina en la posición aminoacídica 185 sustituida con ácido glutámico (V185E). La presente divulgación también proporciona secuencias de ácido nucleico que comprenden una delección de la base citosina en la posición 1132 (c1132del) del alelo *metK*. En algunos aspectos, los alelos *metK* mutantes proporcionados por la presente divulgación dan como resultado enzimas MetK con pérdida de función parcial. Las posiciones aminoacídicas se refieren a las secuencias de aminoácidos de MetK natural, como se muestra en la figura 8A y SEQ ID NO:30.

Microorganismos para su uso en los presentes procedimientos

Como se describe en el presente documento y a modo de ejemplo, se genomanipularon células huésped de *E. coli* para que las bacterias produjeran metionina en un grado o extensión suficiente para la prevención o reducción de la incorporación errónea de norleucina durante la producción de proteínas recombinantes, incluyendo la producción de proteínas recombinantes realizada a densidades de células huésped altas. En consecuencia, en algunos modos de realización proporcionados en el presente documento, la presente divulgación proporciona cepas de microorganismos mutantes (es decir, células huésped de microorganismos mutantes) que producen metionina en un grado o extensión suficiente para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en proteínas o polipéptidos (por ejemplo, en un grado o extensión suficiente para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en proteínas recombinantes o polipéptidos recombinantes, o en un grado o extensión suficiente para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en proteínas heterólogas o polipéptidos heterólogos).

Las células huésped de *E. coli* de partida adecuadas para su uso en los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen, por ejemplo, (pero no se limitan a) *E. coli* W3110, *E. coli* 294, *E. coli* X1776, etc. Estos ejemplos de células huésped de *E. coli* son ilustrativos en lugar de limitantes. La cepa de *E. coli* W3110 es una cepa huésped común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. También se pueden emplear células huésped de *E. coli* mutantes de cualquiera de las cepas de células huésped de *E. coli* mencionadas anteriormente como células huésped de partida que a continuación se modifican además para contener los alelos *metA* y/o *metK* mutados descritos en el presente documento.

La presente divulgación muestra que el uso de células huésped de *E. coli* que comprenden diversos alelos mutantes y combinaciones de alelos mutantes para *metA* y *metK* en la producción de proteínas recombinantes fue eficaz para prevenir la incorporación errónea de norleucina en proteínas recombinantes expresadas. (Véase el ejemplo 4 a continuación).

La presente divulgación proporciona un microorganismo, en el que el microorganismo produce metionina en un grado o extensión suficiente para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en proteínas o polipéptidos. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un microorganismo, en el que el microorganismo es un microorganismo con homoserina succiniltransferasa insensible a la autorregulación. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante, en el que el alelo *metA* mutante codifica una sustitución aminoacídica R27C en MetA, una sustitución aminoacídica Q64E en MetA, una sustitución aminoacídica Y294C en MetA, una sustitución aminoacídica I296S en MetA o una sustitución aminoacídica P298L en MetA. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante que codifica más de una sustitución aminoacídica descrita anteriormente, incluyendo, por ejemplo, un alelo *metA*

mutante que codifica una sustitución aminoacídica I296S y una sustitución aminoacídica P298L en MetA. En diversos aspectos, el microorganismo que comprende una cualquiera o más de las secuencias de ácido nucleico proporcionadas por la presente divulgación es una bacteria; en otros aspectos, el microorganismo es *E. coli*. La presente divulgación proporciona específicamente el uso de microorganismos descritos en el presente documento para la producción de polipéptidos heterólogos (por ejemplo, recombinantes) y proteínas heterólogas (por ejemplo, recombinantes), en el que la incorporación errónea de norleucina en los polipéptidos heterólogos y proteínas heterólogas se reduce o se previene.

Como se describe anteriormente, la presente divulgación proporciona microorganismos que comprenden uno o más alelos *metA* mutantes. En algunos modos de realización, los alelos *metA* mutantes codifican una sustitución aminoacídica R27C en MetA, codifican una sustitución aminoacídica Q64E en MetA, codifican una sustitución aminoacídica Y294C en MetA, o codifican una sustitución aminoacídica I296S y una sustitución aminoacídica P298L en MetA, se codifican por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:23 (R27C), SEQ ID NO:26 (Q64E), SEQ ID NO:24 (Y294C) o SEQ ID NO:25 (I296S y P298L), respectivamente. En otros modos de realización, los microorganismos proporcionados por la presente divulgación comprenden alelos *metA* mutantes codificados por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:23 (R27C), SEQ ID NO:26 (Q64E), SEQ ID NO:24 (Y294C) o SEQ ID NO:25 (I296S y P298L). En diversos aspectos, un microorganismo que comprende una cualquiera o más de las secuencias de ácido nucleico proporcionadas por la presente divulgación es una bacteria; en otros aspectos, el microorganismo es *E. coli*. La presente divulgación proporciona específicamente el uso de microorganismos descritos en el presente documento para la producción de polipéptidos heterólogos (por ejemplo, recombinantes) y proteínas heterólogas (por ejemplo, recombinantes), en el que la incorporación errónea de norleucina en los polipéptidos heterólogos y proteínas heterólogas se reduce o se previene.

Como se establece anteriormente, la presente divulgación proporciona procedimientos para prevenir o reducir la incorporación de norleucina en proteínas y polipéptidos expresados por un microorganismo, en los que el microorganismo es un microorganismo que produce metionina en un grado o extensión suficiente para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en proteínas o polipéptidos. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un microorganismo, en el que el microorganismo es un microorganismo desreprimido para la producción de metionina. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metK* mutante. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metK* mutante, en el que el alelo *metK* mutante codifica una sustitución aminoacídica V185E en MetK. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metK* mutante, en el que el alelo *metK* mutante comprende una delección de la citosina del ácido nucleico en el residuo de ácido nucleico 1132 del alelo *metK*. En diversos aspectos, un microorganismo que comprende una cualquiera o más de las secuencias de ácido nucleico proporcionadas por la presente divulgación es una bacteria; en otros aspectos, el microorganismo es *E. coli*. La presente divulgación proporciona específicamente el uso de los microorganismos descritos en el presente documento para la producción de polipéptidos heterólogos (por ejemplo, recombinantes) y proteínas heterólogas (por ejemplo, recombinantes), en el que la incorporación errónea de norleucina en los polipéptidos heterólogos y proteínas heterólogas se reduce o se previene.

Como se describe anteriormente, la presente divulgación proporciona microorganismos que comprenden uno o más alelos *metK* mutantes. En algunos modos de realización, los alelos *metK* mutantes que codifican una sustitución aminoacídica V185E en MetK o que comprenden una delección de la citosina del ácido nucleico en el residuo aminoacídico 1132 del alelo *metK*, se codifican por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:27 (V185E) o una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:28 (c1132del), respectivamente. En otros modos de realización, los microorganismos proporcionados por la presente divulgación comprenden alelos *metK* mutantes codificados por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:27 (V185E) o SEQ ID NO:28 (c1132del). En diversos aspectos, el microorganismo que comprende una cualquiera o más de las secuencias de ácido nucleico proporcionadas por la presente divulgación es una bacteria; en otros aspectos, el microorganismo es *E. coli*. La presente divulgación proporciona específicamente el uso de cualquier microorganismo descrito en el presente documento para la producción de polipéptidos heterólogos (por ejemplo, recombinantes) y proteínas heterólogas (por ejemplo, recombinantes), en el que la incorporación errónea de norleucina en los polipéptidos heterólogos y proteínas heterólogas se reduce o se previene.

El uso de cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica los alelos *metA* o *metK* que dan como resultado las sustituciones aminoacídicas descritas en el presente documento se contempla específicamente en el presente documento para su uso en los procedimientos de la presente divulgación.

En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante. En algunos modos de realización, un microorganismo proporcionado por la presente divulgación es un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, en el que el alelo *metA* mutante codifica una sustitución aminoacídica Y294C en MetA y el alelo *metK* mutante codifica una sustitución aminoacídica V185E en MetK. En algunos modos de realización proporcionados por la

presente divulgación, el microorganismo es un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, en el que el alelo *metA* mutante codifica una sustitución aminoacídica Y294C en MetA y el alelo *metK* mutante comprende una delección de la citosina del ácido nucleico en el residuo aminoacídico 1132 del alelo *metK*. En diversos aspectos, un microorganismo que comprende una cualquiera o más de las secuencias de ácido nucleico proporcionadas por la presente divulgación es una bacteria; en otros aspectos, el microorganismo es *E. coli*. La presente divulgación proporciona específicamente el uso de cualquier microorganismo descrito en el presente documento para la producción de polipéptidos heterólogos (por ejemplo, recombinantes) y proteínas heterólogas (por ejemplo, recombinantes), en el que la incorporación errónea de norleucina en los polipéptidos heterólogos y proteínas heterólogas se reduce o se previene.

Producción de cepas de microorganismos

La presente divulgación proporciona procedimientos para producir un microorganismo (por ejemplo, células huésped de *E. coli*), en el que el microorganismo produce metionina en un grado o extensión suficiente para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en polipéptidos y proteínas. A modo de ejemplo, se generaron células huésped de *E. coli* que comprenden alelos *metA* mutantes y/o alelos *metK* mutantes usando procedimientos de intercambio alélico conocidos en la técnica y como se describe previamente. (Véase Metcalf *et al.*, (1994) Gene 138:1-7; y Bass *et al.*, (1996) J Bacteriol 178: 1154-61; véase la sección Materiales y procedimientos de la presente memoria descriptiva). La presente divulgación no se limita a los medios por los que se producen células huésped de *E. coli* que comprenden alelos *metA* mutantes y alelos *MetK* mutantes. Diversos procedimientos para introducir alelos mutantes o para producir de otro modo cepas de microorganismos (por ejemplo, bacterias, *E. coli*) que comprenden alelos mutantes son bien conocidos por los expertos en la materia.

Prevención o reducción de la incorporación errónea de norleucina

Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación se pueden aplicar a la producción de proteínas o polipéptidos heterólogos o recombinantes, y se pueden usar con la producción de proteínas o polipéptidos tanto a gran como a pequeña escala. Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación son particularmente útiles para la fermentación de microorganismos de alta densidad, tales como, por ejemplo, células huésped de *E. coli*, para la producción de proteínas y polipéptidos recombinantes. Los procedimientos y composiciones proporcionados por la presente divulgación son útiles para la producción recombinante de proteínas y polipéptidos, en particular para la producción recombinante de proteínas y polipéptidos en los que la incorporación errónea de norleucina es indeseable, tal como, por ejemplo, en proteínas y polipéptidos recombinantes para su uso en diversas aplicaciones de investigación y terapéuticas.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo es un microorganismo con homoserina succiniltransferasa resistente a la autorregulación o insensible a la autorregulación. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo es un microorganismo desreprimido para la producción de metionina. En algunos modos de realización, el microorganismo con homoserina succiniltransferasa resistente a la autorregulación o insensible a la autorregulación es un microorganismo que comprende un alelo *metA* mutante. En algunos modos de realización, el microorganismo desreprimido para la producción de metionina es un microorganismo que comprende un alelo *metK* mutante. En otros modos de realización, el microorganismo para su uso en prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante, en los que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:26. En otros modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante, en los que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica MetA, en los que la secuencia de ácido nucleico codifica una sustitución aminoacídica en MetA seleccionado del grupo que consiste en R27C, Q64E, Y294C, I296S y P298L. En otros modos de realización, la secuencia de ácido nucleico codifica sustituciones aminoacídicas en MetA que consisten en I296S y P298L. Las posiciones aminoacídicas se refieren a la secuencia de aminoácidos de MetA natural como se muestra en la figura 7A y SEQ ID NO:29.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la

proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metK* mutante, en los que el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metK* mutante, en los que el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica MetK, en los que la secuencia de ácido nucleico codifica la sustitución aminoacídica V185E en MetK. En otros modos de realización, la secuencia de ácido nucleico comprende una delección de la base citosina en la posición de residuo de ácido nucleico 1132 en el alelo *metK*. Las posiciones aminoacídicas se refieren a la secuencia de aminoácidos de MetK natural, como se muestra en la figura 8A y SEQ ID NO:30.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, y además en los que el alelo *metA* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:24, y el alelo *metK* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:27. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK* mutante, en los que el alelo *metA* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:24, y el alelo *metK* mutante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:28.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK*, en los que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la sustitución aminoacídica Y294C en MetA, y el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la sustitución aminoacídica V185E en MetK. En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o polipéptido en un microorganismo, en los que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante y un alelo *metK*, en los que el alelo *metA* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la sustitución aminoacídica Y294C en MetA, y el alelo *metK* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una delección de la base citosina en la posición de residuo de ácido nucleico 1132 en el alelo *metK*. Las posiciones aminoacídicas se refieren a la secuencia de aminoácidos de MetA natural como se muestra en la figura 7A y SEQ ID NO:29 y se refieren a la secuencia de aminoácidos de MetK natural como se muestra en la figura 8A y SEQ ID NO:30.

En algunos aspectos de los procedimientos para reducir o prevenir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido por un microorganismo proporcionado en el presente documento, el microorganismo es una bacteria, en particular una *E. coli*. En otros aspectos, la proteína o polipéptido es una proteína heteróloga o un polipéptido heterólogo, o una proteína recombinante o un polipéptido recombinante. Por ejemplo, el microorganismo puede comprender un ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido heterólogo al microorganismo; por ejemplo, el microorganismo se transforma con un ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido heterólogo al microorganismo, que puede ser, por ejemplo, ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), como por el uso de un vector de expresión recombinante. En otros aspectos, el procedimiento comprende además cultivar el microorganismo en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína o polipéptido. En algunos modos de realización, el microorganismo se cultiva en un medio de cultivo, en el que el medio de cultivo contiene una concentración baja de metionina. A continuación la proteína o polipéptido se puede recuperar, purificar, etc.; la recuperación puede ser, por ejemplo, del periplasma o medio de cultivo del microorganismo. En algunos aspectos, el cultivo tiene lugar en un fermentador, tal como, por ejemplo, cultivo en condiciones de fermentación de alta densidad celular.

Un ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína o polipéptido heterólogo se inserta adecuadamente en un vector replicable para la expresión en el microorganismo bajo el control de un promotor adecuado. Están disponibles muchos vectores para este propósito, y la selección del vector apropiado dependerá, por ejemplo, del tamaño del ácido nucleico que se va a insertar en el vector o la célula huésped de microorganismo particular que se va a transformar con el vector. Los vectores adecuados son bien conocidos para un experto en la técnica.

Los procedimientos y composiciones proporcionados por la presente divulgación son particularmente útiles para la producción de proteínas y polipéptidos recombinantes en los que la incorporación errónea de norleucina es indeseable, tal como, por ejemplo, en proteínas y polipéptidos recombinantes para su uso en diversas aplicaciones terapéuticas, médicas, de investigación y diagnósticas. Por ejemplo, los procedimientos y composiciones de la presente divulgación son aplicables para la producción recombinante de anticuerpos terapéuticos, tales como, por ejemplo, anticuerpos policlonales y monoclonales para su uso médico y farmacéutico. Los ejemplos de anticuerpos policlonales y monoclonales para su uso médico y farmacéutico

incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos anti-factor D, anticuerpos anti-receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (por ejemplo, anticuerpos anti-MET), etc.

Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación también son útiles para la producción de fragmentos de anticuerpos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocaténario (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La producción de anticuerpos recombinantes como se proporciona por los presentes procedimientos, composiciones y microorganismos, se puede realizar por la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo y la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadena ligera de anticuerpo dentro de un microorganismo como se describe anteriormente (por ejemplo, célula huésped bacteriana, *E. coli*). En algunos aspectos, la cadena pesada de anticuerpo y la cadena ligera de anticuerpo son polipéptidos de anticuerpo de cadena pesada y cadena ligera de longitud completa. En otros aspectos, la cadena pesada de anticuerpo es una cadena pesada de fragmento Fab de anticuerpo, y la cadena ligera de anticuerpo es una cadena ligera de fragmento Fab de anticuerpo.

Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación también son útiles para la producción de anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos multiespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína, o se pueden unir a dos epítopos diferentes de dos proteínas diferentes. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983); publicación de solicitud internacional n.º WO 93/08829; Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)); y genomaniplulación "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168).

Adicionalmente, los procedimientos y composiciones de la presente divulgación son útiles para la producción de otras biomoléculas para aplicaciones terapéuticas y de investigación, tales como, por ejemplo, hormona del crecimiento humano (somatotropina), insulina, etc.

EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la divulgación. Se entiende que se pueden practicar otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Materiales y procedimientos

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas usadas en los ejemplos descritos en el presente documento son derivadas de la cepa W3110 de *E. coli*. (Véase Bachmann (1972) *Bacteriol Rev* 36:525-557). Se mantuvo la selección de antibióticos para todos los marcadores en las siguientes concentraciones: carbenicilina (plásmido o cromosómico), 50 µg/ml; kanamicina (cromosómica), 30 µg/ml; tetraciclina (plásmido o cromosómico), 10 µg/ml.

Cepas y construcción de plásmidos

Los oligonucleótidos usados en la construcción de plásmidos y cepas bacterianas (es decir, *E. coli*) se enumeran en la tabla 1 a continuación. Se usaron técnicas estándar para la clonación, análisis de ADN, amplificación por PCR, transformación, electroporación y transducción P1. Se movieron alelos cromosómicos por transducción P1. Se derivó el alelo *metJ::Kan^R* de la cepa bacteriana JW3909-1, que se obtuvo de The Coli Genetic Stock Center (CGSC, Universidad de Yale). Se confirmaron todos los reemplazos alélicos por análisis de PCR.

Tabla 1

Denominación de cebador	Secuencia (5'-3') ^a	
SacI- <i>metA</i> flank-F	CACACGAGCTCCTCATTTTGCTCATTAACGTTGG	SEQ ID NO: 1
Sall- <i>metA</i> flank-R	CACACGTCGACGCGAATGGAAGCTG	SEQ ID NO: 2
SacI- <i>metK</i> flank-F	CACACGAGCTCGTATGCAAAGCAGAGATGC	SEQ ID NO: 3
Sall- <i>metK</i> flank-R	CACACGTCGACCGTCATTGCCTTGTTTG	SEQ ID NO: 4

<i>metA</i> flankmid-F	GTTCTGATCCTTAACCTGATGCCGAAGAAG	SEQ ID NO: 5
<i>metA</i> flankmid-R	CCAGCGTTTGCGCATCATATTCGG	SEQ ID NO: 6
<i>metK</i> flankmid-F	GGCAAAACACCTTTTTACGTCCGAGTCC	SEQ ID NO: 7
<i>metK</i> flankmid-R	GAATCAGTACCAGCAGGGTCAGTTG	SEQ ID NO: 8
pS1080-P	CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG	SEQ ID NO: 9
pS1080-T	AGTGAACGGCAGGTATATGTGATGG	SEQ ID NO: 10
QC- <i>metAR</i> 27C-F	GTGATGACAACTTCT ^a <u>GTGCGTCTGGTCAGG</u>	SEQ ID NO: 11
QC- <i>metAR</i> 27C-R	CCTGACCAGACGC ^a <u>CA</u> AGAAGTTGTCATCAC	SEQ ID NO: 12
QC- <i>metAQ</i> 64E-F	CAAATCACCCTTTG ^a <u>AGGTCGATATTCAGC</u>	SEQ ID NO: 13
QC- <i>metAQ</i> 64E-R	GCTGAATATCGACCT ^a <u>c</u> CAAAGGTGAGTTTG	SEQ ID NO: 14
QC- <i>metAY</i> 294C-F	GCTCAACTATTACGTCT ^a <u>g</u> CCAGATCACGCCATACG	SEQ ID NO: 15
QC- <i>metAY</i> 294C-R	CGTATGGCGTGATCTGG ^a <u>c</u> AGACGTAATAGTTGAGC	SEQ ID NO: 16
QC- <i>metAI</i> 296SP298L-F	CGTCTACCAGA ^a <u>g</u> CACGCT ^a <u>ATACGATCTACG</u>	SEQ ID NO: 17
QC- <i>metAI</i> 296SP298L-R	CGTAGATCGTAT ^a <u>a</u> GCGTG ^a <u>c</u> TCTGGTAGACG	SEQ ID NO: 18
QC- <i>metKV</i> 185E-F	ATCGATGCTGT ^a <u>CGa</u> GCTTTCCACTCAG	SEQ ID NO: 19
QC- <i>metKV</i> 185E-R	CTGAGTGGAAAGC ^a <u>c</u> GCACAGCATCGAT	SEQ ID NO: 20
QC- <i>metKc</i> 1132del-F	GCGCAGCTGCTGG ^a <u>CGATGCTGCCG</u>	SEQ ID NO: 21
QC- <i>metKc</i> 1132del-R	CGGCAGCATCGC ^a <u>CAGCAGCTGCGC</u>	SEQ ID NO: 22

^a Los residuos de ácido nucleico subrayados introducen mutaciones aminoacídicas. Los residuos de ácido nucleico en minúsculas indican residuos diferentes de la secuencia de ácido nucleico natural.

Se amplificó por PCR el gen *metA* a partir de la cepa bacteriana W3110 (Bachmann (1972) Bacteriol Rev 36:525-557) usando los cebadores *SacI*-*metA*flank-F y *Sall*-*metA*flank-R, digeridos con *SacI* y *Sall*, y se unió en el plásmido digerido con *SacI* y *Sall* pS1080 para obtener el plásmido pS1080-*metA*flank. Se construyeron los plásmidos pS1080-*metA*flank(R27C), pS1080-*metA*flank(Q64E), pS1080-*metA*flank(Y294C) y pS1080-*metA*flank(I296SP298L) mutagenizando el plásmido pS1080-*metA*flank usando un kit QuikChange (Stratagene) y los siguientes conjuntos de cebadores: (QC-*metAR*27C-F;QC-*metAR*27C-R), (QC-*metAQ*64E-F;QC-*metAQ*64E-R), (QC-*metAY*294C-F;QC-*metAY*294C-R) y (QC-*metAI*296SP298L-F;QC-*metAI*296SP298L-R), respectivamente.

Se amplificó por PCR el gen *metK* a partir de la cepa bacteriana W3110 usando los cebadores *SacI*-*metK*flank-F y *Sall*-*metK*flank-R, se digirió con *SacI* y *Sall*, y se unió en el plásmido digerido con *SacI* y *Sall* pS1080 para obtener el plásmido pS1080-*metK*flank. Se construyeron los plásmidos pS1080-*metK*flank(V185E) y pS1080-*metK*flank(c1132del) mutagenizando el plásmido pS1080-*metK*flank usando un kit QuikChange (Stratagene) y el siguiente conjunto de cebadores: (QC-*metKV*185E-F;QC-*metKV*185E-R) y (QC-*metKc*1132del-F;QC-*metKc*1132del-R), respectivamente.

Se llevó a cabo el intercambio alélico usando los procedimientos descritos previamente. (Véase Metcalf *et al.*, (1994) Gene 138:1-7; y Bass *et al.*, (1996) J Bacteriol 178: 1154-61).

Como se establece anteriormente, se realizó el intercambio alélico usando el protocolo descrito por Metcalf *et al.* (*supra*) como se modifica por Bass *et al.* (*supra*). Se transfirieron los cointegrados en el fondo de célula huésped 60E4 o fondo de célula huésped 66H8. Después de la contraselección de sacarosa, se cribaron las colonias resistentes a sacarosa para determinar la sensibilidad a carbenicilina por siembra en estrías de réplicas en placas de agar LB y agar LB que contienen carbenicilina. Posteriormente se aislaron colonias sensibles a carbenicilina y se confirmó el intercambio alélico por amplificación por PCR de todo el marco de lectura de *metA* o *metK* seguido de secuenciación de ADN. El vector plasmídico suicida pS1080 contiene el origen R6Ky condicional y el marcador seleccionable de resistencia a carbenicilina, así como un gen *sacB* contraseleccionable, que confiere sensibilidad a la sacarosa.

Las cepas bacterianas y los plásmidos usados en los experimentos descritos en el presente documento se enumeran en la tabla 2 a continuación.

5

Tabla 2

Cepa o plásmido	Genotipo o descripción	Ref. o fuente
W3110	F ⁻ lambda ⁻ IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1 <i>rph</i> -1	Recogida de laboratorio
JW3909-1	(Δ <i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3) λ ⁻ <i>rph</i> -1 Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, Δ <i>metJ</i> 725::kan ^R <i>hsdR</i> 514	CGSC
60E4	W3110 Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>tonA</i>) Δ <i>ptr</i> Δ <i>ompT</i> Δ <i>degP</i> Δ <i>phoA</i> <i>ilvG</i> + Δ <i>fuc</i> Δ <i>rha</i>	Recogida de laboratorio
66G6	60E4 Δ <i>metJ</i> 725::kan ^R	Este estudio
66H6	60E4 <i>metA</i> (R27C)	Este estudio
66H8	60E4 <i>metA</i> (Y294C)	Este estudio
67B8	60E4 <i>metA</i> (I296SP298L)	Este estudio
67B9	60E4 <i>metA</i> (Q64E)	Este estudio
67C2	60E4 <i>metA</i> (Y294C) <i>metK</i> (V185E)	Este estudio
67C3	60E4 <i>metA</i> (Y294C) <i>metK</i> (c1132del)	Este estudio
66F8	W3110 Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>tonA</i>) Δ <i>phoA</i> <i>ilvG</i> 2096 (<i>IlvG</i> ⁺ ; Val ^I) Δ <i>manA</i> Δ <i>prc</i> <i>spr</i> 43H1 Δ <i>degP</i> <i>lacI</i> ^f Δ <i>ompT</i> Δ <i>menE</i>	Recogida de laboratorio
67C5	66F8 <i>metA</i> (Y294C)	Este estudio
64B4	W3110 Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>tonA</i>) Δ <i>phoA</i> <i>ilvG</i> 2096 (<i>IlvG</i> ⁺ ; Val ^I) Δ <i>manA</i> Δ <i>prc</i> <i>spr</i> 43H1 Δ <i>degP</i> <i>lacI</i> ^f Δ <i>ompT</i>	Recogida de laboratorio
67C4	64B4 <i>metA</i> (Y294C)	Este estudio
pS1080	Vector suicida de intercambio alélico contraseleccionable, origen R6K γ , SacB, Carb ^f	Recogida de laboratorio
pS1080- <i>metA</i>	<i>MetA</i> en pS1080	Este estudio
pS1080- <i>metK</i>	<i>MetK</i> en pS1080	Este estudio
pS1080- <i>metA</i> (R27C)	<i>MetA</i> con mutación R27C clonada en pS1080	Este estudio
pS1080- <i>metA</i> (Q64E)	<i>MetA</i> con mutación Q64E clonada en pS1080	Este estudio
pS1080- <i>metA</i> (Y294C)	<i>MetA</i> con mutación Y294C clonada en pS1080	Este estudio
pS1080- <i>metA</i> (I296SP298L)	<i>MetA</i> con mutaciones I296S y P298L clonadas en pS1080	Este estudio
pS1080- <i>metK</i> (V185E)	<i>MetK</i> con mutación V185E clonada en pS1080	Este estudio
pS1080- <i>metK</i> (c1132del)	<i>MetK</i> con delección de citosina en la posición 1132 clonada en pS1080	Este estudio

Fermentación

- 10 Se transformó la cepa huésped de *E. coli* 60E4 con un plásmido de expresión basado en pBR322 que contiene ácido polinucleico que codifica una cadena ligera y una cadena pesada de un fragmento de unión a antígeno (Fab) de anticuerpo anti-VEGF (SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34, respectivamente). (Véase el anticuerpo anti-VEGF Y0317 en la publicación de solicitud internacional n.º WO1998/45331; publicación de solicitud internacional n.º WO2002/40697 (ejemplo 2, que describe la fermentación del anticuerpo anti-VEGF Y0317); y Chen *et al.*, (1999) J Mol Biol 293:865-881, anticuerpo anti-VEGF Y0317).
- 15

Se transformó la cepa huésped de *E. coli* 66F8 con un plásmido de expresión que contiene ácido polinucleico que codifica una cadena ligera y una cadena pesada de un fragmento de unión a antígeno (Fab) de anticuerpo anti-factor D, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48 y SEQ ID NO:49,

respectivamente. (Véase el anticuerpo anti-factor D número 238-1 en la publicación de solicitud internacional n.º WO2009/134711 y el anticuerpo anti-factor D número 111 en la publicación de solicitud internacional n.º WO2008/055206).

- 5 Se transformó la cepa huésped de *E. coli* 64B4 con un plásmido de expresión que contiene ácido polinucleico que codifica una cadena ligera, una cadena pesada y un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-MET correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 y SEQ ID NO:52, respectivamente).
- 10 Se controló la expresión de los polipéptidos del fragmento Fab de la cadena pesada y de la cadena ligera recombinantes por el promotor phoA, produciéndose la inducción tras la disminución del fosfato inorgánico en el medio. (Véase Laird *et al.*, (2005) Protein Expr Purif 39:237-246). Se dirigieron los polipéptidos del fragmento Fab de la cadena pesada y de la cadena ligera para la exportación al periplasma de *E. coli* por una secuencia señal STII, donde se ensambló el producto. Se llevaron a cabo fermentaciones de alta densidad celular en el volumen de trabajo de 10 l (WV) como se describe previamente. (Véase Simmons *et al.*, (2002) J Immunol Methods 263:133-147). A una densidad celular de aproximadamente DO₅₅₀ 200, se inició una alimentación continua de metionina al 3 % o agua y se alimentó durante el resto del proceso de fermentación.
- 15 Se examinaron tres procesos de fermentación diferentes usando la célula huésped 60E4 (proceso de fermentación AF1), célula huésped 66F8 (proceso de fermentación AF2) y célula huésped 64B4 (proceso de fermentación AF3). (Véase el ejemplo 5 y la tabla 4 a continuación).

Purificación

- 25 Después de que se completaran las fermentaciones, se enfrió el caldo celular completo a <15 °C en el fermentador y se procesó el caldo enfriado para la purificación de proteínas. Se mezcló un volumen del caldo enfriado se mezcló con 0,06 volúmenes de MgSO₄ (concentración final 60 mM) y se valoró a pH 3,8 con ácido cítrico (1 M). A continuación se rompieron células usando un microfluidizador a aproximadamente 82,7 MPa (12.000 psi) (Microfluidics, Redwood Shores, CA) y se incubaron las células rotas a 35 °C durante 3 horas con agitación continua. Se diluyó el homogeneizado 3 veces con agua purificada fría y se centrifugó el homogeneizado diluido a 6.000xg usando un rotor de ángulo fijo a 4 °C durante 20 minutos. Se filtró el sobrenadante usando filtros de 0,22 µm y se valoró a pH 7,5 con base Tris 1,5 M.
- 30 Se purificó la proteína Fab recombinante usando cromatografía de afinidad de proteína G como sigue. Se rellenaron columnas de cromatografía Poly-prep (Bio Rad) con resina Sepharose 4 Fast Flow con proteína G (GE Healthcare) y se equilibraron con al menos 5 volúmenes de columna de PBS, pH 7,2. Se cargó el sobrenadante filtrado en la columna de relleno de Proteína G, se lavó dos veces con PBS y se eluyó con ácido cítrico 50 mM. Se valoró el grupo de proteínas Fab final hasta pH 7 con base Tris 1,5 M y se analizó para determinar el contenido de norleucina como se describe a continuación. Esto corresponde a la purificación del proceso de fermentación AF1.
- 35 Se usaron tres procesos de purificación de productos de proteínas recombinantes diferentes, cada uno específico para el proceso de fermentación AF1 (para la célula huésped 60E4), AF2 (para la célula huésped 66F8) o AF3 (para la célula huésped 64B4). (Véase el ejemplo 7 y la tabla 6 a continuación).
- 40
- 45

Análisis de aminoácidos

- 50 Para determinar los niveles de metionina intracelular, se sedimentaron muestras de caldo celular completo que contenían $87,6 \times 10^9$ células a 17.000xg durante 5 minutos a 4 °C, se lavaron una vez en PBS y a continuación se resuspendieron en tampón de extracción (Tris 10 mM, EDTA 5 mM, yodoacetamida (IAM) 5 mM, 0,2 mg/ml de lisozima, pH 6,8). A continuación se lisaron las células por dos ciclos de sonicación y a continuación se centrifugaron durante 20 minutos a 13.500 rpm para retirar los residuos celulares. Se transfirieron los sobrenadantes a filtros de tubo de microcentrífuga de 0,2 µm (Bio Rad) y se centrifugaron a 17.000xg durante 5 minutos a 4 °C. Se diluyeron los filtrados y se analizaron los aminoácidos como se describe previamente (Feeney *et al.*, (2013) Biotechnology and Bioengineering, 110:1087-1097). Para determinar los niveles de metionina extracelular, se diluyeron muestras de sobrenadante preparadas a partir de caldo celular completo recogido durante la fermentación después de centrifugación durante 3 min a 14.000xrpm y se analizaron los aminoácidos como se describe a continuación. (Véase Feeney *et al.*, (2013) Biotechnology and Bioengineering, 110:1087-1097).
- 55
- 60 Se analizaron las concentraciones de aminoácidos usando un procedimiento de HPLC de fase inversa. Se trataron muestras que contienen aminoácidos con carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo para producir derivados altamente fluorescentes. (Véase Cohen y Michaud (1993) Anal Biochem 211:279-287). Los ensayos de HPLC usados detectaron los siguientes aminoácidos con un límite de detección de 0,01 mM: histidina, asparagina, serina, glutamina, arginina, glicina, aspartato, glutamato, treonina, alanina, prolina, ornitina, cisteína, lisina, tirosina, metionina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina y triptófano.
- 65

Niveles de fosfato

Se midieron niveles de fosfato usando COBAS Integra 400 (Roche Diagnostics) de acuerdo con los procedimientos publicados previamente. (Véase Taussky y Shorr (1953) J Biol Chem 202:675-685).

Medidas de valores

Se diluyeron muestras de caldo celular completo 6 veces con tampón de extracción (Tris 10 mM, EDTA 5 mM, IAM 5 mM, 0,2 mg/ml de lisozima, pH 6,8) y se incubaron durante 10 minutos en hielo. Después de dos rondas de sonicación, se centrifugaron las muestras a 17.000×g durante 20 minutos a 4 °C. Se determinó el valor del producto a partir de sobrenadantes usando HPLC.

Mediciones de DO₅₅₀ integradas

Se determinó la DO₅₅₀ integrada usando integración trapezoidal usando la siguiente fórmula:

$$DO_{i550} = \sum_{i=j}^{i=k} (t_i - t_{i-1}) \frac{(DO_{550,i} + DO_{550,i-1})}{2}$$

donde,

j = índice de la primera medición realizada en o después de 24 horas de tiempo de cultivo; k = número total de mediciones de DO₅₅₀ realizadas; t_i = tiempo de cultivo transcurrido en horas en la medición i; DO_{550,i} = DO₅₅₀ en la medición i.

Análisis de norleucina

Para el análisis del contenido de norleucina, se sometieron muestras de proteínas recombinantes purificadas a digestión con tripsina basada en un procedimiento descrito previamente. (Véase Yu *et al.*, (2009) Anal Chem 81:9282-9290). Se realizó el análisis del mapa de péptidos usando una HPLC de fase inversa y cromatografía de líquidos en línea-espectrometría de masas en tándem (CL/EM) como se describe anteriormente. (Véase Yu *et al.*, (2009) Anal Chem 81:9282-9290; y Yu *et al.*, (2011) Anal Chem 83:5912-5919). Se realizó la determinación de masas de alta resolución con un instrumento LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific, San Jose, EE. UU.) usando un barrido de estudio de EM completa con una resolución fijada a 60.000 a m/z 400, seguido de barridos por MS2 con trampa iónica para los iones de interés. Para la determinación del nivel relativo de norleucina dentro de los polipéptidos, se generaron cromatogramas de iones extraídos para ambos péptidos que contienen metionina y que contienen norleucina usando el estado de carga más abundante con un margen de extracción de m/z monoisotópico m/z ±10 ppm. Se calculó la cantidad relativa de especies que contienen norleucina con relación a la de especies que contienen metionina usando las respectivas áreas máximas integradas.

Inmunoelectrotransferencias

Se diluyeron muestras de caldo celular completo obtenidas durante la fermentación 6 veces con tampón de extracción (Tris 10 mM, EDTA 5 mM, IAM 5 mM, 0,2 mg/ml de lisozima, pH 6,8) y se incubaron durante 10 minutos en hielo. Después de dos rondas de sonicación, se centrifugaron las muestras a 17.000×g durante 25 minutos a 4 °C. Se cargaron muestras en geles de Tris-glicina al 4-12 % en condiciones no reductoras. Se transfirió proteína a membranas de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia iBlot (Invitrogen). Se bloquearon las membranas con gelatina al 0,5 % en tampón NET (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tris 50 mM, TritonX-100 al 0,05 %) durante 30 minutos, seguido de incubación en una dilución 1:300.000 de fracción de IgG de cabra conjugada con peroxidasa en Fab IgG humana (MP Biomedical) en el tampón de bloqueo. Después de lavar 3 veces con tampón NET, se visualizaron las transferencias en una película de rayos X usando Western Lightning ECL Substrate (PerkinElmer) después de una exposición de 5 segundos.

Ejemplo 1. Incorporación errónea de norleucina durante la fermentación de *E. coli*

Como se describe anteriormente, la incorporación errónea de norleucina se produce a menudo durante la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. La extensión de la incorporación errónea de norleucina durante la producción de proteínas recombinantes depende de varios factores, tales como, por ejemplo, la naturaleza de la proteína recombinante, el proceso de fermentación usado y el contenido del medio de fermentación. (Véase, por ejemplo, Bogosian *et al.*, (1989) Biol Chem 264:531-539).

Para examinar la incorporación errónea de norleucina en un proceso de fermentación de expresión de proteínas recombinantes, se realizó el siguiente estudio. Se transformó la cepa huésped de *E. coli* 60E4 con un plásmido que contiene secuencias de ácido nucleico que codifican una cadena ligera y una cadena pesada de un

fragmento de anticuerpo Fab (SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:32, respectivamente) y se usó en los siguientes estudios de fermentación usando una alimentación de agua o alimentación de metionina de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente. A continuación se analizaron las proteínas recombinantes expresadas para determinar el contenido de norleucina usando los procedimientos descritos anteriormente.

Como se muestra en la tabla 3 a continuación, se observó aproximadamente un 5-10 % de incorporación errónea de norleucina en cada uno de los polipéptidos recombinantes expresados en la célula huésped de *E. coli* 60E4 en ausencia de alimentación de metionina continua (es decir, una alimentación de agua). Como se esperaba, en presencia de una alimentación de metionina continua, no se detectó norleucina (ND) en ningún polipéptido recombinante expresado.

Tabla 3

Cepa	Alimentación	Norleucina en péptido 1 (%)	Norleucina en péptido 2 (%)
60E4	Met	ND	ND
60E4	Agua	5,1 ± 0,7	10 ± 1,2
60E4	Sin alimentación		
66H6	Agua	ND	ND
66H8	Agua	ND	ND
66H8	Sin alimentación	ND	ND
67B8	Agua	ND	ND
67B9	Agua	ND	ND
67C2	Agua	ND	ND
67C3	Agua	ND	ND

Estos resultados confirmaron que se produjo incorporación errónea de norleucina en la producción de proteínas recombinantes en bacterias en ausencia de alimentación de metionina.

Ejemplo 2. Construcción de células huésped de *E. coli* mutantes de la vía biosintética de metionina

Como se establece anteriormente, a menudo se usa alimentación continua de metionina durante la fermentación de proteínas recombinantes para prevenir la incorporación errónea de norleucina. Como se muestra anteriormente en el ejemplo 1, la alimentación de metionina continua garantizó que estuviera disponible suficiente metionina para la célula huésped, reduciendo o previniendo así la incorporación errónea de norleucina durante la producción de proteínas recombinantes. Para examinar el efecto del uso de una célula huésped de *E. coli* que contiene los alelos *metA* y/o *metK* mutantes sobre la incorporación errónea de norleucina, en lugar de usar una alimentación de metionina continua, se realizaron los siguientes estudios.

En los presentes estudios, se introdujeron alelos *metA* que contienen las mutaciones R27C, Q64E, Y294C, I296S y P298L, lo que da como resultado MetA resistente a la autorregulación, en células huésped 60E4 usando un procedimiento de intercambio alélico (véase Materiales y procedimientos anteriormente) para obtener las cepas de células huésped bacterianas 66H6 (60E4 *metA*(R27C)), 66H8 (60E4 *metA*(Y294C)), 67B8 (60E4 *metA*(Q64E)) y 67B9 (60E4 *metA*(I296S P298L)), respectivamente (véanse las tablas 2 y 3 anteriores).

Se introdujeron alelos *metK* que contienen las mutaciones V185E y c1132del (delección de la base citosina en la posición 1132 en el gen *metK*), lo que da como resultado enzimas MetK con pérdida de función parcial, en células huésped 66H8 (60E4 *metA*(Y294C)) usando un procedimiento de intercambio alélico (véase Materiales y procedimientos anteriormente) para obtener las cepas de células huésped bacterianas 67C2 (66H8 *metK*(V185E)) y 67C3 (66H8 *metK*(c1132del)), respectivamente. (Véanse las tablas 2 y 3 anteriores).

Se evaluaron estas células huésped de *E. coli* para determinar la incorporación errónea de norleucina durante la producción de proteínas recombinantes en un proceso de fermentación realizado sin alimentación de metionina continua. (Véase el ejemplo 3 a continuación).

Ejemplo 3. Resultados de fermentación

Se ejecutaron fermentaciones a pequeña escala (10 l) sin alimentación de metionina continua utilizando las cepas bacterianas mutantes de la vía biosintética de metionina construidas en este estudio. (Véase la tabla 1). Se reemplazó la alimentación de metionina por agua o bien no se usó alimentación durante el proceso de

fermentación en estos experimentos. Se realizaron tres fermentaciones de 10 l usando la cepa de células huésped de control 60E4 como sigue: 1) una alimentación de metionina continua, 2) una alimentación de agua continua y 3) sin alimentación.

Las tendencias de fermentación para crecimiento celular, como se siguió por DO_{550} , se muestran en la figura 12A. Independientemente de la naturaleza de la alimentación (metionina, agua o sin alimentación), el crecimiento de las ss mutantes de la vía biosintética de metionina 60E4 *metA*(R27C), 60E4 *metA*(Y294C), 60E4 *metA*(Y294C) *metK*(V185E) y 60E4 *metA*(Y294C) *metK*(c1132del) fue comparable al observado en células huésped de control durante la fase de crecimiento de la fermentación (5-28 horas). Sin embargo, las células huésped mutantes dobles 60E4 *metA*(Y294C) *metK*(V185E), y 60E4 *metA*(Y294C) *metK*(c1132del) tuvieron una DO_{550} menor (área bajo la curva de crecimiento de 24 horas hasta el final de la fermentación) en comparación con la observada en fermentaciones de células huésped de control. (Véase la figura 12B). Las fermentaciones realizadas con alimentación de agua usando las células huésped 60E4 y 60E4 *metA*(Y294C) tuvieron una DO_{550} ligeramente mayor en comparación con la observada en la fermentación de células huésped de control realizada con una alimentación de metionina y la fermentación de células huésped 60E4 *metA*(Y294C) sin alimentación, respectivamente. Las células mutantes 60E4 $\Delta metJ::kan^R$ y 60E4 *metA*(I296S P298L) tuvieron fases de adaptación más largas y como resultado tuvieron una DO_{550} menor en comparación con la observada en fermentaciones de células huésped de control. (Véanse las figuras 12A y 12B). La célula huésped mutante 60E4 *metA*(Q64E) creció escasamente en el fermentador, logrando una DO_{550} máxima de 150, que es aproximadamente un 30-40 % menor en comparación con la DO_{550} máxima observada en fermentaciones usando otras células huésped mutantes. (Véase la figura 12A). Después de 20 horas, el crecimiento de la célula huésped mutante 60E4 *metA*(Q64E) logró saturación y, como resultado, la fermentación usando esta célula huésped mutante tuvo la DO_{550} más baja. (Véanse las figuras 12A y 12B).

La presencia o ausencia de una alimentación de metionina durante la fermentación no afectó al crecimiento de las células huésped 60E4. (Véase la figura 12C).

Las fermentaciones usando los mutantes de la vía biosintética de metionina acumularon niveles mayores de metionina tanto *in vivo* (es decir, intracelulares) como en el medio extracelular en comparación con lo observado en la fermentación de células huésped de control. (Véanse las figuras 13A, 13B, 14A y 14B). Al comienzo del proceso de fermentación, existe un exceso de metionina (>3 mM) en el medio de fermentación. A medida que las células comienzan a crecer, captan metionina para la síntesis de proteínas, el papel donante de metilo y otras funciones. Como resultado, la concentración de metionina extracelular disminuye gradualmente a medida que las células continúan creciendo y los niveles de metionina extracelular logran niveles inferiores a los detectables (<10 μ M) aproximadamente a las 16 horas. (Véanse las figuras 13A y 14A).

A las 16 horas, las concentraciones de metionina intracelular varían de 0,5-2,5 mM (la concentración se basa en el volumen celular) entre diferentes huéspedes. (Véanse las figuras 13B y 14B). A dichas concentraciones de metionina intracelular altas, se inhibiría fuertemente MetA natural; sin embargo, los mutantes de MetA resistentes a la autorregulación solo se pueden inhibir débilmente y, por tanto, permiten que las células huésped mutantes produzcan metionina por medio de la vía biosintética. (Véase Usuda y Kurahashi (2005) Appl Environ Microbiol 71:3228-3234). Sin embargo, los niveles de metionina intracelular continuaron disminuyendo hasta aproximadamente las 28 horas, momento en el que el crecimiento celular se ralentizó considerablemente. Es posible que durante la fase de crecimiento bacteriano (5-28 horas) de las fermentaciones, la tasa a la que se utiliza la metionina para la síntesis de proteínas y otras funciones celulares pueda exceder la tasa a la que se sintetiza la metionina *in vivo*. Esto puede explicar la disminución gradual en los niveles de metionina intracelular hasta el final de la fase de crecimiento.

Durante la fase de producción de proteínas recombinantes de la fermentación (28 horas hasta el final de la fermentación), las células huésped que sobreproducen metionina continúan sintetizando metionina *in vivo* y los niveles de metionina intracelular continuaron incrementando durante esta fase del proceso de fermentación. (Véanse las figuras 13B y 14B). Estos resultados sugirieron que durante la fase de producción de proteínas recombinantes de la fermentación, la tasa de biosíntesis de metionina excedió la tasa a la que se utilizó la metionina para diversas funciones intracelulares.

Durante la fermentación de células huésped de control realizada con una alimentación de agua continua, tanto los niveles de metionina extracelular como intracelular continuaron disminuyendo, alcanzando niveles inferiores al límite de detección del ensayo (10 μ M) aproximadamente a las 16 horas para la metionina extracelular y aproximadamente a las 24 horas para la metionina intracelular. Para una fermentación del huésped de control realizada con una alimentación de metionina continua, la alimentación garantiza que exista un exceso de metionina en la célula después de aproximadamente 26 horas, momento en el que se inicia la alimentación. Durante la fase de producción de la fermentación, la célula huésped mutante doble 60E4 *metA*(Y294C) *metK*(V185E) acumuló más metionina intracelular en comparación con la observada en la fermentación de la célula huésped de control realizada con una alimentación de metionina continua.

La fase de adaptación más larga de las células huésped 60E4 *metA*(I296S P298L) and 60E4 Δ *metJ*::kan^R y el escaso crecimiento de la célula huésped 60E4 *metA*(Q64E) en comparación con el observado en las células huésped de control se podrían deber potencialmente a los niveles altos de acumulación de homocisteína, un intermedio tóxico en la vía biosintética de metionina. (Véase Roe *et al.*, (2002) Microbiology 148:2215-2222; véase la figura 12A). Se demostró previamente que la homocisteína inhibe la enzima implicada en la primera etapa de la vía biosintética de isoleucina, la treonina desaminasa, provocando la inhibición del crecimiento. (Véase Tuite *et al.*, (2005) J Bacteriol 187:4362-4371). Esto se examinó midiendo los niveles de isoleucina intracelular en las células huésped mutantes. El análisis mostró que los niveles de isoleucina intracelular fueron comparables a los observados en células huésped de control durante la fermentación (datos no mostrados). La posibilidad de que la homocisteína tenga otros efectos tóxicos sobre el crecimiento celular no se puede descartar por completo. En este momento, sin embargo, estas diferencias de crecimiento entre los mutantes no se entienden completamente.

La evolución temporal para los valores de los productos de proteínas y los datos de inmunoelectrotransferencias se muestran en las figuras 16A, 16B y 17. La fermentación inoculada de la célula huésped 60E4 *metA*(Q64E) produjo menos producto que el observado en otras células huésped. Excepto por un breve período de entre 45-50 horas, los niveles de fosfato nunca disminuyeron durante la fermentación del huésped 60E4 *metA*(Q64E) (figura 15); por tanto, la síntesis de proteínas recombinantes fue baja. La fase de adaptación extendida de las células huésped mutantes 60E4 *metA*(I296S P298L) y 60E4 Δ *metJ*::kan^R dio como resultado la disminución de fosfato después de 40 horas, lo que es aproximadamente 12 horas después de lo observado normalmente; por tanto, las fermentaciones usando estas células huésped tuvieron valores de productos de proteínas menores en comparación con los observados en otras células huésped mutantes que disminuyeron el fosfato antes. (Véanse las figuras 12A, 15 y 16A).

Las fermentaciones usando las células huésped 60E4 *metA*(R27C) y 60E4 *metA*(Y294C) produjeron los valores de productos de proteínas más altos entre todas las células huésped mutantes examinadas.

Las fermentaciones usando las células huésped mutantes dobles *metA metK*, 60E4 *metA*(Y294C) *metK*(V185E) y 60E4 *metA*(Y294C) *metK*(c1132del), produjeron valores de productos de proteínas algo bajos a pesar de tener un crecimiento comparable a las células huésped de control. Estas células huésped mutantes dobles tienen una mutación en el gen *metK* que da como resultado MetK con pérdida de función parcial. El producto de MetK es S-adenosilmetionina (SAM), un donante de metilo para muchas reacciones en células bacterianas. Sin embargo, no se sabe por qué la disminución en los niveles de SAM afectaría a los valores de los productos de proteínas. Una alimentación continua durante el proceso de fermentación podría dar como resultado la dilución del medio de cultivo, lo que posiblemente podría dar como resultado densidades celulares menores y posiblemente valores de productos menores. El crecimiento y los valores de la fermentación de la célula huésped 60E4 *metA*(Y294C) sin ninguna alimentación fueron comparables a los observados en fermentaciones usando la misma célula huésped realizadas con una alimentación de agua continua.

Ejemplo 4. Incorporación errónea de norleucina

Como se describe anteriormente, la incorporación errónea de norleucina en proteínas debido a los niveles de metionina en la célula es lo suficientemente baja como para que la norleucina pueda competir por los residuos de metionina en la carga del metionil ARNt durante la síntesis de proteínas. Como se muestra en el ejemplo 1 anterior, la fermentación de células huésped de control realizada sin alimentación de metionina dio como resultado niveles altos de incorporación errónea de norleucina en la proteína recombinante (tabla 3). Los niveles de metionina intracelular bajos durante la fase de producción de la fermentación de células huésped de control realizada sin alimentación de metionina indicaron que los residuos de norleucina podrían competir con los residuos de metionina en la proteína recombinante. Sin embargo, se observaron niveles altos de metionina extracelular e intracelular durante la fase de producción de las fermentaciones de células huésped mutantes. (Véanse las figuras 13B y 14B). Como resultado de los niveles de metionina intracelular elevados, se espera que la incorporación errónea de norleucina sea mínima o se elimine al usar dichas fermentaciones de células huésped.

La digestión con tripsina de la proteína recombinante proporcionó 2 péptidos que contenían metionina: péptido 1: LSCAASGYDFTHYGM³⁴NWVR (SEQ ID NO:35); y péptido 2: STAYLQM⁸³NSLR (SEQ ID NO:36). El análisis del mapa de péptidos indicó que los grupos de proteínas recombinantes purificados a partir de fermentaciones de células huésped mutantes contenían niveles menores que detectables de incorporación errónea de norleucina, mientras que la fermentación de células huésped de control realizada sin alimentación de metionina acumuló niveles altos de norleucina en ambos péptidos que contenían metionina. (Véase la tabla 3). Estos resultados mostraron que el uso de cepas de células huésped de *E. coli* de la presente divulgación dio como resultado la reducción o prevención de la incorporación de norleucina en polipéptidos heterólogos (por ejemplo, recombinantes).

Ejemplo 5. Células huésped bacterianas adicionales

Además de los experimentos realizados con la célula huésped 60E4 o células huésped derivadas de 60E4, se desarrollaron otras dos células huésped bacterianas y se examinaron para determinar su crecimiento, incorporación errónea de norleucina y producción de proteínas recombinantes como sigue.

Las células huésped bacterianas 66F8 y 64B4 (así como la célula huésped bacteriana 60E4) se describen anteriormente en la tabla 2. Como se muestra en la tabla 2, existen varias diferencias en el genotipo de las células huésped 60E4 en comparación con las células huésped 66F8 y 64B4 (que comparten un genotipo similar).

Se examinaron tres procesos de fermentación diferentes usando la célula huésped 60E4 (proceso de fermentación AF1), célula huésped 66F8 (proceso de fermentación AF2) y célula huésped 64B4 (proceso de fermentación AF3). La tabla 4 a continuación muestra las diferencias en diversos parámetros de fermentación (pH, agitación, duración del cultivo y tiempo de inicio de alimentación) de cada uno de los procesos de fermentación (AF1, AF2 y AF3) examinados.

Tabla 4

	AF1	AF2	AF3
Huésped de control	60E4	66F8	64B4
pH	7,0	7,0	7,3
Agitación (rpm)	850 ^a	650	650
Duración del cultivo (horas)	72	50	72
Tiempo de inicio de alimentación (met. o agua) (DO ₅₅₀)	200	150	150

^a Después de que las células logren una DO₅₅₀ de 200, se reduce la agitación a 800 y a continuación en etapas de 100 rpm cada 2 horas hasta lograr 500 rpm.

Se introdujo el alelo *metA*(Y294C) en las células huésped 66F8 y 64B4 usando los procedimientos como se describe anteriormente en el ejemplo 1 para la célula huésped 60E4. Las fermentaciones realizadas usando 66F8 *metA*(Y294C) y 64B4 *metA*(Y294C), usando el proceso de fermentación AF2 y AF3, respectivamente, mostraron crecimiento de células huésped comparable al observado con sus células huésped originales. (Véanse las figuras 19A y 19B; y la tabla 5 a continuación).

Ejemplo 6. Comparación de tasas de crecimiento de células huésped de *E. coli* y rendimientos de productos de proteínas recombinantes

Se examinaron las tasas de crecimiento y los rendimientos de productos de proteínas recombinantes en cada una de las cepas de huésped de *E. coli* 60E4 *metA*(Y294C), 66F8 *metA*(Y294C) y 64B4 *metA*(Y294C) usando el proceso de fermentación AF1, AF2, AF3, respectivamente. Se realizaron fermentaciones de 10 l como se describe anteriormente en el ejemplo 3 para células huésped de la cepa 60E4, usando las modificaciones del proceso de fermentación como se explica anteriormente en la tabla 4 para cada proceso de fermentación.

Se analizan las tasas de crecimiento y los rendimientos de productos de proteínas recombinantes observados para las diversas células huésped de la cepa 60E4 en detalle anteriormente en el ejemplo 3.

Como se muestra en las figuras 20A, 20B y 20C, los rendimientos de productos de proteínas recombinantes obtenidos usando las cepas huésped 60E4 *metA*(Y294C), 66F8 *metA*(Y294C) y 64B4 *metA*(Y294C) fueron comparables a los observados usando las cepas huésped 60E4, 66F8 y 64B4. (Véase también la tabla 5 a continuación). La presencia o ausencia de alimentación de metionina no afectó a los rendimientos de proteínas recombinantes obtenidos de la fermentación de la célula huésped 60E4.

Tabla 5

Huésped	Alimentación	Proceso	Tasa de crecimiento, μ (h ⁻¹) ^a	Rendimiento de producto (g/l) ^b
60E4 (huésped de control)	met	AF1	0,325 ± 0,02	1,077 ± 0,047
60E4 (huésped de control)	agua	AF1	0,343	1,152
60E4 (huésped de control)	ninguno	AF1	0,358 ± 0,15	1,098

60E4 <i>metJ</i>	agua	AF1	0,232	0,486
60E4 <i>metA</i> (R27C)	agua	AF1	0,332	0,792
60E4 <i>metA</i> (Y294C)	agua	AF1	0,333	0,906
60E4 <i>metA</i> (Y294C)	ninguno	AF1	0,377 ± 0,023	0,924 ± 0,017
60E4 <i>metA</i> (Q64E)	agua	AF1	0,294	0,102
60E4 <i>metA</i> (I296S P298L)	agua	AF1	0,278	0,57
60E4 <i>metA</i> (Y294C) <i>metK</i> (V185E)	agua	AF1	0,356	0,696
60E4 <i>metA</i> (Y294C) <i>metK</i> (V185E)	agua	AF1	0,301	0,618
60E4 <i>metA</i> (Y294C)	ninguno ^c	AF1	0,314	0,936
66F8 (huésped de control)	met	AF2	0,459 ± 0,025	4,5 ± 0,5
66F8 <i>metA</i> (Y294C)	ninguno	AF2	0,381 ± 0,03	6,7 ± 0,2
64B4 (huésped de control)	met	AF3	0,406 ± 0,037	5,1 ± 0,2
64B4 <i>metA</i> (Y294C)	ninguno	AF3	0,361 ± 0,01	5,4 ± 0,1

^a Para los huéspedes 60E4 *metJ* y 60E4 *metA metA*(I296S P298L), se usó el tiempo entre 6-14 horas y 14-22 horas respectivamente para calcular μ . Para todos los otros huéspedes, se usó 2-10 horas para calcular μ . Los valores de μ mostrados son el promedio de n=2 ciclos.

^b Los valores mostrados son el promedio de n=2 ciclos.

^c Se añadió norleucina en bolo a una concentración final de 0,15 mM durante la fermentación cuando las células lograron una DO₅₅₀ de 200.

Ejemplo 7. Comparación de la incorporación errónea de norleucina

Se usaron tres procesos de purificación de productos de proteínas recombinantes diferentes, cada uno específico para el proceso de fermentación AF1 (para la célula huésped 60E4), AF2 (para la célula huésped 66F8) y AF3 (para la célula huésped 64B4). La tabla 6 a continuación muestra las diferencias en los diversos procesos de purificación usados para cada uno de los procesos de fermentación (es decir, AF1, AF2 y AF3) examinados.

Tabla 6

	AF1	AF2	AF3
Floculante ^a	MgSO ₄ (50 mM)	MgSO ₄ (50 mM)	Polietiliminina (0,4 %)
Homogeneizado mantenido	3 horas a 35 °C	21 horas a 30 °C	12 horas a 30 °C
Resina de afinidad	Proteína G	Proteína G	MabSelect Sure
Tampón de elución	Ácido cítrico (50 mM)	Ácido cítrico (50 mM)	Fosfato de glicina (75 mM), pH 3,3

^a Se indican concentraciones finales para el floculante

Se realizó la cuantificación de norleucina usando el análisis CL-EM en péptidos tripsínicos para cada uno de los productos de proteínas recombinantes como se describe anteriormente.

La digestión con tripsina de la proteína recombinante producida por el huésped 60E4 produjo 2 péptidos que contenían metionina (tabla 7). La digestión con tripsina de la proteína recombinante producida por el huésped 66F8 produjo 3 péptidos que contenían metionina (tabla 8). La digestión con tripsina de la proteína recombinante producida por el huésped 64B4 produjo 6 péptidos que contenían metionina (tabla 9).

Tabla 7

Péptidos tripsínicos	SEQ ID NO:	60E4 con alimentación de met.	60E4	60E4 <i>metA</i> (Y294C)
STAYLQ <u>M</u> NSLR	36	ND	10 ± 1,2	ND
LSCAASGYDFTHYGM <u>M</u> NWVR	35	ND	5,1 ± 0,7	ND

Tabla 8

Péptidos tripsínicos	SEQ ID NO:	66F8 con alimentación de met.	66F8	66F8 <i>metA</i> (Y294C)
ASGYTFTNYGM <u>M</u> NWVR	37	ND	2,1 ± 0,4	ND
QAPGQGLEW <u>M</u> GWINTYTGETTYADD <u>F</u> K	38	ND	0,7 ± 0,2	ND
VTITCITSTDIDDD <u>M</u> NWYQQKPGK	39	ND	1 ± 0,3	ND

Tabla 9

Péptidos tripsínicos	SEQ ID NO:	64B4 con alimentación de met.	64B4	64B4 <i>metA</i> (Y294C)
GLEWVG <u>M</u> IDPSNSDTR	40	ND	1,3 ± 0,3	ND
NTAYLQ <u>M</u> NSLR	41	ND	1,3 ± 0,3	ND
DTL <u>M</u> ISR	42	ND	2,4 ± 0,4	ND
EEM <u>M</u> TK	43	ND	2,2 ± 0,5	ND
WQQGNVIFSCSV <u>M</u> HEALHNHYTQK	44	ND	1,5 ± 0,4	ND
DIQ <u>M</u> TQSPSSLSASVGDR	45	ND	1,3 ± 0,2	ND

10 La proteína recombinante purificada a partir del proceso de fermentación AF1 realizado sin alimentación de metionina usando el huésped 60E4 acumuló un 5,1 % y un 10 % de norleucina en los dos residuos de metionina en la proteína (tabla 7). No se detectó norleucina en la proteína recombinante purificada a partir de las fermentaciones AF1 realizadas sin alimentación de metionina usando los huéspedes 60E4 *metA*(Y294C) (tabla 7), 60E4 *metA*(R27C), 60E4 *metA*(Y294C) *metK*(V185E) y 60E4 *metA*(Y294C) *metK*(c1132del) (datos no mostrados).

15 Cuando la fermentación del huésped 60E4 *metA*(Y294C) se complementó con norleucina (concentración final 0,15 mM) en el medio de fermentación, no se observó norleucina en la proteína recombinante, lo que indica que las células huésped bacterianas de la presente divulgación producen suficiente metionina en la célula para prevenir la incorporación errónea de norleucina durante la síntesis de proteínas recombinantes.

20 Se observó aproximadamente un 2,7 %, 0,7 % y un 1 % de incorporación errónea de norleucina en los tres péptidos tripsínicos que contenían metionina obtenidos de la proteína recombinante producida por el proceso de fermentación AF2 realizado sin alimentación de metionina usando el huésped 66F8. (Véase la tabla 8). De forma similar, existió aproximadamente un 1,3 %, 1,3 %, 2,4 %, 2,2 %, 1,5 % y un 1,3 % de incorporación errónea de norleucina en los seis péptidos tripsínicos que contenían metionina obtenidos de la proteína recombinante producida por el proceso AF3 realizado sin alimentación de met. usando el huésped 64B4. (Véase la tabla 9). Sin embargo, no se detectó norleucina en las proteínas recombinantes purificadas a partir de los procesos de fermentación AF2 y AF3 usando el huésped 66F8 *metA*(Y294C) y los huéspedes 64B4 *metA*(Y294C), respectivamente. (Véanse las tablas 8 y 9 anteriores).

30 Los análisis del mapa de péptidos tripsínicos que los grupos de proteínas recombinantes purificados a partir de fermentaciones de células huésped mutantes contenían niveles menores que detectables de incorporación

errónea de norleucina, mientras que la fermentación de células huésped de control realizada sin alimentación de metionina acumuló niveles altos de norleucina en los péptidos que contenían metionina. Estos resultados mostraron que el uso de cepas de células huésped de *E. coli* de la presente divulgación dio como resultado la reducción o prevención de la incorporación de norleucina en polipéptidos heterólogos (por ejemplo, recombinantes).

Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	GENENTECH, INC. <i>ET AL.</i>	
5	<120>	PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA PREVENIR LA INCORPORACIÓN ERRÓNEA DE NORLEUCINA EN PROTEÍNAS	
	<130>	P4967R1-WO	
10	<140>		
	<141>		
	<150>	61/777.700	
	<151>	12/03/2013	
15	<150>	61/703.142	
	<151>	19/09/2012	
	<160>	52	
20	<170>	PatentIn versión 3.5	
	<210>	1	
	<211>	34	
25	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<221>	fuelle	
30	<223>	/nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400>	1	
		cacacgagct cctcattttg ctcattaacg ttgg	34
35	<210>	2	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
40	<220>		
	<221>	fuelle	
	<223>	/nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400>	2	
45		cacacgtcga cgcgaatgga agctg	25
	<210>	3	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
50	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<221>	fuelle	
	<223>	/nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
55	<400>	3	
		cacacgagct cgtatgcaaa gcagagatgc	30
	<210>	4	
60	<211>	28	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 4	
10	cacacgtcga ccgtcattgc cttgtttg	28
	<210> 5	
	<211> 30	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
20	<400> 5	
	gttctgatcc ttaacctgat gccgaagaag	30
	<210> 6	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
30	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 6	
	ccagcgtttg cgcacatat tcgg	24
35	<210> 7	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 7	
45	ggcaaaacac ctttttacgt ccgagtcc	28
	<210> 8	
	<211> 27	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
55	<400> 8	
	gaactcacgt accagcaggg tcagttg	27
	<210> 9	
60	<211> 26	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 9	
10	ccagtcacga cgttgtaaaa cgacgg	26
	<210> 10	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
20	<400> 10	
	agtgaacggc aggtatatgt gatgg	25
	<210> 11	
	<211> 31	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
30	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 11	
	gtgatgacaa cttcttgtgc gtctggtcag g	31
35	<210> 12	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 12	
45	cctgaccaga cgcacaagaa gttgtcatca c	31
	<210> 13	
	<211> 30	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
55	<400> 13	
	caaactcacc tttggaggtc gatattcagc	30
	<210> 14	
60	<211> 30	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 14	
10	gctgaatatc gacctccaaa ggtgagtttg	30
	<210> 15	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
20	<400> 15	
	gctcaactat tacgtctgcc agatcacgcc atacg	35
	<210> 16	
	<211> 35	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
30	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 16	
	cgtatggcgt gatctggcag acgtaatagt tgagc	35
35	<210> 17	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
	<400> 17	
45	cgtctaccag agcacgctat acgatctacg	30
	<210> 18	
	<211> 30	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"	
55	<400> 18	
	cgtagatcgt atagcgtgct ctggtagacg	30
	<210> 19	

	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 19		
10	atcgatgctg tcgagctttc cactcag		27
	<210> 20		
	<211> 27		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
20	<400> 20		
	ctgagtggaa agctcgacag catcgat		27
	<210> 21		
25	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
	<400> 21		
35	gcgcagctgc tggcgatgct gccg		24
	<210> 22		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"		
45	<400> 22		
	cggcagcatc gccagcagct gcgc		24
	<210> 23		
	<211> 930		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
55	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"		
	<400> 23		

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttcttg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgcatt cccgtgaatc gcgcaacacg      240
cccgagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgtcgcttac      360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt      420
gtctgctggg cggtagaggg cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc      480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgacaaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac      840
ggtaattttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat      900
ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa                                     930

```

<210> 24
 <211> 930
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 <400> 24

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc	60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgatc	120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgctcct gctttcaaac	180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgcatt cccgtgaatc gcgcaacacg	240
cccgagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt	300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcctggtgg agtttaatga tgcgcttac	360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt	420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc	480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg	540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg	600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat	660
ctgtttgccg gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg	720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagacct ggatgtaccg	780
tataactatt tcccgacaaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac	840
ggtaattttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct gccagatcac gccatacgat	900
ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa	930

<210> 25
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 25

ES 2 705 493 T3

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgata      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgctcct gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgatt cccgtgaatc gcgcaacacg      240
cccgagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcttggtgg agtttaatga tgcgcttac      360
tgccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt      420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgctcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc      480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagacct ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgacaaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac      840

```

<210> 26
 <211> 930
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 <400> 26

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttctcg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgac      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgctcct gctttcaaac      180
tcacctttgg aggtcgatat tcagctgttg cgcctcgatt cccgtgaatc gcgcaacacg      240
cccgagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgtg ggcctggtgg agtttaatga tgcgcttac      360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt      420
gtctgctggg cggtacaggc cgcgtcaat atcctctacg gcattcctaa gcaaactcgc      480
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgt atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgccg gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagacct ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac      840
ggtaatttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat      900
ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa      930

```

<210> 27
 <211> 1155
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 27

```

atggcaaaac accttttttac gtccgagtcg gtctctgaag ggcatcctga caaaattgct      60
gaccaaattt ctgatgccgt tttagacgcg atcctcgaac aggatccgaa agcacgcggt      120
gcttgcgaaa cctacgtaaa aaccggcatg gttttagttg gcggcgaaat caccaccagc      180
gcctgggtag acatcgaaga gatcaccctg aacaccgttc gcgaaattgg ctatgtgcat      240
tccgacatgg gctttgacgc taactcctgt gcggttctga gcgctatcgg caaacagtct      300
cctgacatca accagggcgt tgaccgtgcc gatccgctgg aacagggcgc gggtgaccag      360
ggctctgatgt ttggctacgc aactaatgaa accgacgtgc tgatgccagc acctatcacc      420
tatgcacacc gtctggtaca gcgtcaggct gaagtgcgta aaaacggcac tctgccgtgg      480
ctgcgcccgg acgcgaaaag ccagggtgact tttcagtatg acgacggcaa aatcgttgg      540
atcgatgctg tcgagctttc cactcagcac tctgaagaga tcgaccagaa atcgctgcaa      600
gaagcggtaa tggaagagat catcaagcca attctgcccg ctgaatggct gacttctgcc      660
accaaattct tcatcaaccc gaccggtcgt ttcgttatcg gtggcccaat gggtgactgc      720
ggctctgactg gtcgtaaaat tatcgttgat acctacggcg gcatggcgcg tcacggtggc      780
gggtgcattct ctggtaaaga tccatcaaaa gtggaccgtt ccgcagccta cgcagcacgt      840
tatgtcgcga aaaacatcgt tgctgctggc ctggccgatac gttgtgaaat tcaggtttcc      900
tacgcaatcg gcgtggctga accgacctcc atcatggtag aaactttcgg tactgagaaa      960
gtgccttctg aacaactgac cctgctggta cgtgagttct tcgacctgcg ccatacgg      1020
ctgattcaga tgctggatct gctgcacccg atctacaaaag aaaccgcagc atacggtcac      1080
tttggtcgtg aacattttccc gtgggaaaaa accgacaaaag cgcagctgct gcgcgatgct      1140
gccggtctga agtaa                                     1155

```

<210> 28
 <211> 1154
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 <400> 28


```

atggcaaaac accttttttac gtccgagtcg gtctctgaag ggcatcctga caaaattgct      60
gaccaaattt ctgatgccgt tttagacgcg atcctcgaac aggatccgaa agcacgcgtt      120
gcttgcgaaa cctacgtaaa aaccggcatg gtttttagttg gcggcgaaat caccaccagc      180
gcctgggtag acatcgaaga gatcaccctg aacaccgttc gcgaaattgg ctatgtgcat      240
tccgacatgg gctttgacgc taactcctgt gcggttctga gcgctatcgg caaacagtct      300
cctgacatca accagggcgt tgaccgtgcc gatccgctgg aacagggcgc gggtgaccag      360
ggctctgatgt ttggctacgc aactaatgaa accgacgtgc tgatgccagc acctatcacc      420
tatgcacacc gtctgggtaca gcgtcaggct gaagtgcgta aaaacggcac tctgccgtgg      480
ctgcgcccgg acgcgaaaag ccaggtgact tttcagtatg acgacggcaa aatcgttggg      540
atcgatgctg tcgtgctttc cactcagcac tctgaagaga tcgaccagaa atcgctgcaa      600
gaagcggtaa tggaagagat catcaagcca attctgcccg ctgaatggct gacttctgcc      660
accaaattct tcatcaaccc gaccggctgt ttcgttatcg gtggcccaat gggtgactgc      720
ggctctgactg gtcgtaaaat tatcgttgat acctacggcg gcatggcgcg tcacgggtggc      780
ggtgcaattct ctggtaaaga tccatcaaaa gtggaccgtt ccgcagccta cgcagcacgt      840
tatgtcgcga aaaacatcgt tgctgctggc ctggccgatc gttgtgaaat tcaggtttcc      900
tacgcaatcg gcgtggctga accgacctcc atcatggtag aaactttcgg tactgagaaa      960
gtgccttctg aacaactgac cctgctggta cgtgagttct tcgacctgcg cccatacggg     1020
ctgattcaga tgctggatct gctgcacccg atctacaaag aaaccgcagc atacggtcac     1080
tttggctgtg aacattttccc gtgggaaaaa accgacaaag cgcagctgct ggcgatgctg     1140
ccggtctgaa gtaa                                             1154

```

<210> 29
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 29
 Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
 1 5 10 15

 Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu
 20 25 30

 Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile
 35 40 45

 Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln
 50 55 60

ES 2 705 493 T3

Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr
 65 70 75 80
 Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln
 85 90 95
 Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
 100 105 110
 Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
 115 120 125
 Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala
 130 135 140
 Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
 145 150 155 160
 Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
 165 170 175
 Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala His Ser Arg
 180 185 190
 Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu Glu
 195 200 205
 Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser Lys
 210 215 220
 Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala Gln
 225 230 235 240
 Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp Pro
 245 250 255
 Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr Pro
 260 265 270
 Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp Leu
 275 280 285
 Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met Asn
 290 295 300
 Pro Thr Leu Asp
 305

ES 2 705 493 T3

<210> 30
 <211> 384
 <212> PRT
 5 <213> Escherichia coli

<400> 30
 Met Ala Lys His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro
 1 5 10 15
 Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu
 20 25 30
 Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr
 35 40 45
 Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp
 50 55 60
 Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His
 65 70 75 80
 Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile
 85 90 95
 Gly Lys Gln Ser Pro Asp Ile Asn Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp Pro
 100 105 110
 Leu Glu Gln Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr
 115 120 125
 Asn Glu Thr Asp Val Leu Met Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His Arg
 130 135 140
 Leu Val Gln Arg Gln Ala Glu Val Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro Trp
 145 150 155 160
 Leu Arg Pro Asp Ala Lys Ser Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp Asp Gly
 165 170 175
 Lys Ile Val Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu
 180 185 190
 Glu Ile Asp Gln Lys Ser Leu Gln Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile
 195 200 205
 Lys Pro Ile Leu Pro Ala Glu Trp Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe Phe
 210 215 220

ES 2 705 493 T3

Ile Asn Pro Thr Gly Arg Phe Val Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys
225 230 235 240

Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala
245 250 255

Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val Asp
260 265 270

Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala
275 280 285

Ala Gly Leu Ala Asp Arg Cys Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile Gly
290 295 300

Val Ala Glu Pro Thr Ser Ile Met Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys
305 310 315 320

Val Pro Ser Glu Gln Leu Thr Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe Asp Leu
325 330 335

Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Gln Met Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr
340 345 350

Lys Glu Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu His Phe Pro Trp
355 360 365

Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys
370 375 380

- 5 <210> 31
<211> 930
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 31

ES 2 705 493 T3

```

atgccgattc gtgtgccgga cgagctaccc gccgtcaatt tcttgctga agaaaacgtc      60
tttgtgatga caacttcttg tgcgtctggt caggaaattc gtccacttaa ggttctgac      120
cttaacctga tgccgaagaa gattgaaact gaaaatcagt ttctgcgctt gctttcaaac      180
tcacctttgc aggtcgatat tcagctgttg cgcacgcatt cccgtgaatc gcgcaacacg      240
cccgagagc atctgaacaa cttctactgt aactttgaag atattcagga tcagaacttt      300
gacggtttga ttgtaactgg tgcgccgctg ggcttggtgg agtttaatga tgcgcttac      360
tggccgcaga tcaaacaggt gctggagtgg tcgaaagatc acgtcacctc gacgctgttt      420
accgaaaaac tctctggcgt ttacgagcat catattctcc atcctcatgc gcttctgacg      540
cgtggctttg atgattcatt cctggcaccg cattcgcgct atgctgactt tccggcagcg      600
ttgattcgtg attacaccga tctggaaatt ctggcagaga cggaagaagg ggatgcatat      660
ctgtttgcca gtaaagataa gcgcattgcc tttgtgacgg gccatcccga atatgatgcg      720
caaacgctgg cgcaggaatt tttccgcgat gtggaagccg gactagaccc ggatgtaccg      780
tataactatt tcccgcacaa tgatccgcaa aatacaccgc gagcgagctg gcgtagtcac      840
ggtaattttac tgtttaccaa ctggctcaac tattacgtct accagatcac gccatacgat      900
ctacggcaca tgaatccaac gctggattaa      930

```

```

<210> 32
<211> 1155
5 <212> ADN
  <213> Escherichia coli

<400> 32

```

```

atggcaaaac accttttttac gtccgagtcc gtctctgaag ggcattcctga caaaattgct      60
gaccaaattt ctgatgccgt tttagacgcg atcctcgaac aggatccgaa agcacgcgtt      120
gcttgcgaaa cctacgtaaa aaccggcatg gtttttagttg gcggcgaaat caccaccagc      180
gcctgggtag acatcgaaga gatcaccctg aacaccgttc gcgaaattgg ctatgtgcat      240
tccgacatgg gctttgacgc taactcctgt gcggttctga gcgctatcgg caaacagtct      300
cctgacatca accagggcgt tgaccgtgcc gatccgctgg aacagggcgc gggtgaccag      360
ggctctgatgt ttggctacgc aactaatgaa accgacgtgc tgatgccagc acctatcacc      420
tatgcacacc gtctgggtaca gcgtcaggct gaagtgcgta aaaacggcac tctgccgtgg      480
ctgcgcccgg acgcgaaaag ccagggtgact tttcagtatg acgacggcaa aatcgttggc      540
atcgatgctg tcgtgctttc cactcagcac tctgaagaga tcgaccagaa atcgctgcaa      600
gaagcggtaa tggaagagat catcaagcca attctgcccg ctgaatggct gacttctgcc      660
accaaattct tcatcaaccc gaccggtcgt ttcgttatcg gtggccaat gggtgactgc      720
ggcttgactg gtcgtaaaat tatcgttgat acctacggcg gcatggcgcg tcacgggtggc      780
ggtgcaattct ctggtaaaga tccatcaaaa gtggaccgtt ccgcagccta cgcagcacgt      840
tatgtcgcga aaaacatcgt tgctgctggc ctggccgatac gttgtgaaat tcaggtttcc      900
tacgcaatcg gcgtggctga accgacctcc atcatggtag aaactttcgg tactgagaaa      960
gtgccttctg aacaactgac cctgctggta cgtgagttct tcgacctgcg cccatacggc     1020
ctgattcaga tgctggatct gctgcacccg atctacaaaag aaaccgcagc atacggtcac     1080
tttggtcgtg aacattttccc gtgggaaaaa accgacaaaag cgcagctgct gcgcgatgct     1140
gccggtctga agtaa                                           1155

```

<210> 33
 <211> 642
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 33

ES 2 705 493 T3

gatatccagt tgacccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc 60
atcacctgca gcgcaagtca ggatattagc aactatttaa actgggtatca acagaaacca 120
ggaaaagctc cgaaagtact gatttacttc acctcctctc tccactctgg agtcccttct 180
cgcttctctg gatccgggtc tgggacggat ttcactctga ccatcagcag tctgcagcca 240
gaagacttcg caacttatta ctgtcaacag tatagcaccg tgccgtggac gtttggacag 300
ggtaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgct tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 34
<211> 693
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 34
gagggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctgggtgcagc caggggggctc actccggtttg 60
tcctgtgcag cttctggcta cgacttcacg cactacggta tgaactgggt ccgtcaggcc 120
ccgggttaagg gcctggaatg gggtggatgg attaacacct ataccggtga accgacctat 180
gctgcggatt tcaaacgtcg tttcactttt tctttagaca cctccaaaag cacagcatac 240
ctgcagatga acagcctgcg cgctgaggac actgccgtct attactgtgc aaagtaccgc 300
tactattatg ggacgagcca ctgggtatttc gacgtctggg gtcaaggaac cctgggtcacc 360
gtctcctcgg cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 420
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600
acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt cgacaagaaa 660
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac etc 693

<210> 35
<211> 19
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

5 <400> 35
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr Gly Met Asn
 1 5 10 15

Trp Val Arg

10 <210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 36
Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 1 5 10

20 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

30 <400> 37
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg
 1 5 10 15

35 <210> 38
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 38
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr
 1 5 10 15

Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 20 25

45 <210> 39
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 39
Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn
 1 5 10 15

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 20

5

<210> 40
 <211> 16
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 40
Gly Leu Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg
 1 5 10 15

20

<210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 41
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 1 5 10

30

<210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 42
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 1 5

<210> 43
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 50 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 43

Glu Glu Met Thr Lys
 1 5

5 <210> 44
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 44
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 1 5 10 15

His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 20

15 <210> 45
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 45
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

25 **Asp Arg**

30 <210> 46
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 46

ES 2 705 493 T3

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

- 5 <210> 47
- <211> 231
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 47

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Thr	His	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe	50	55	60	
Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	195	200	205	
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	210	215	220	
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Leu										225	230		

5

<210> 48
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

10

<400> 48
 Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30
 Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Ser Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

ES 2 705 493 T3

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 49

<211> 223

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 49

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Glu Arg Glu Gly Gly Val Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

<210> 50

<211> 220

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

ES 2 705 493 T3

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 51
<211> 449
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 51
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

ES 2 705 493 T3

Ala	Thr	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly		
			100					105					110				
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
		115					120					125					
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu		
	130					135					140						
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp		
145					150					155					160		
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu		
				165					170						175		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
			180					185						190			
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro		
		195					200					205					
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		
	210					215					220						
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro		
225					230					235					240		
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		
				245					250					255			
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
			260					265					270				
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
		275					280					285					
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
	290					295					300						
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
305					310					315					320		
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys		
				325				330						335			
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr		
			340					345					350				

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 52

5 <211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 52

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

15

ES 2 705 493 T3

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en una proteína o polipéptido, comprendiendo el procedimiento expresar la proteína o el polipéptido en un microorganismo, en el que el microorganismo es un microorganismo mutante que produce metionina en un grado o extensión suficiente para prevenir o reducir la incorporación errónea de norleucina en la proteína o polipéptido, en el que el microorganismo comprende un alelo *metA* mutante que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:24.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el microorganismo es una bacteria.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *E. coli*.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que expresar la proteína o el polipéptido en el microorganismo se realiza en ausencia de metionina añadida de forma exógena al medio de cultivo o sin alimentación de metionina.
5. Un procedimiento para producir una proteína o un polipéptido sin incorporación errónea de norleucina en una célula huésped bacteriana, en el que la proteína o el polipéptido no tiene incorporación errónea de norleucina, comprendiendo el procedimiento expresar en la célula huésped bacteriana un ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido en condiciones de cultivo adecuadas para permitir la expresión de la proteína o el polipéptido, en el que la célula huésped bacteriana comprende un alelo *metA* mutante que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:24.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la proteína o el polipéptido es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de anticuerpo anti-VEGF.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de anticuerpo anti-VEGF es el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47.
9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de anticuerpo anti-VEGF se selecciona del grupo que consiste en la secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:33 y la secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:34.
10. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo anti-factor D o un fragmento de anticuerpo anti-factor D.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-factor D o el fragmento de anticuerpo anti-factor D es el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48 y el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49.
12. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo anti-MET o un fragmento de anticuerpo anti-MET.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-MET o un fragmento de anticuerpo anti-MET se selecciona del grupo que consiste en el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, y el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52.
14. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que expresar la proteína o el polipéptido en la célula huésped bacteriana se realiza en ausencia de metionina añadida de forma exógena al medio de cultivo o sin alimentación de metionina.

ATGCCGATTCGTGTGCCGGACGAGCTACCCGCCGTCAATTTCTTGCGTGAAGAAAAC
 GTCTTTGTGATGACAACTTCTTGTGCGTCTGGTCAGGAAATTCGTCCACTTAAGGTT
 CTGATCCTTAACCTGATGCCGAAGAAGATTGAACTGAAAATCAGTTTCTGCGCCTG
 CTTTCAAACCTCACCTTTGCAGGTCGATATTCAGCTGTTGCGCATCGATTCCCGTGAA
 TCGCGCAACACGCCCCGAGAGCATCTGAACAACTTCTACTGTAACCTTTGAAGATATT
 CAGGATCAGAACTTTGACGGTTTGATTGTAACCTGGTGCGCCGCTGGGCCCTGGTGGAG
 TTTAATGATGTCGCTTACTGGCCGCAGATCAAACAGGTGCTGGAGTGGTCGAAAGAT
 CACGTCACCTCGACGCTGTTTGTCTGCTGGGCGGTACAGGCCGCGCTCAATATCCTC
 TACGGCATTCCCTAAGCAAACCTCGCACCGAAAACTCTCTGGCGTTTACGAGCATCAT
 ATTCTCCATCCTCATGCGCTTCTGACGCGTGGCTTTGATGATTTCATTCTGGCACCG
 CATTGCGGCTATGCTGACTTTCCGGCAGCGTTGATTCGTGATTACACCGATCTGGAA
 ATTCTGGCAGAGACGGAAGAAGGGGATGCATATCTGTTTGCCAGTAAAGATAAGCGC
 ATTGCCTTTGTGACGGGCCATCCCGAATATGATGCGCAAACGCTGGCGCAGGAATTT
 TTCCGCGATGTGGAAGCCGGACTAGACCCGGATGTACCGTATAACTATTTCCCGCAC
 AATGATCCGCAAATAACACCGCGAGCGAGCTGGCGTAGTCACGGTAATTTACTGTTT
 ACCAACTGGCTCAACTATTACGTCTACCAGATCACGCCATACGATCTACGGCACATG
 AATCCAACGCTGGATTAA

FIG. 1

ATGCCGATTCGTGTGCCGGACGAGCTACCCGCCGTCAATTTCTTGCGTGAAGAAAAC
 GTCTTTGTGATGACAACTTCTCGTGCCTCTGGTCAGGAAATTCGTCCACTTAAGGTT
 CTGATCCTTAACCTGATGCCGAAGAAGATTGAACTGAAAATCAGTTTCTGCGCCTG
 CTTTCAAACCTCACCTTTGCAGGTCGATATTCAGCTGTTGCGCATCGATTCCCGTGAA
 TCGCGCAACACGCCCCGAGAGCATCTGAACAACTTCTACTGTAACCTTTGAAGATATT
 CAGGATCAGAACTTTGACGGTTTGATTGTAACCTGGTGCGCCGCTGGGCCCTGGTGGAG
 TTTAATGATGTCGCTTACTGGCCGCAGATCAAACAGGTGCTGGAGTGGTCGAAAGAT
 CACGTCACCTCGACGCTGTTTGTCTGCTGGGCGGTACAGGCCGCGCTCAATATCCTC
 TACGGCATTCCCTAAGCAAACCTCGCACCGAAAACTCTCTGGCGTTTACGAGCATCAT
 ATTCTCCATCCTCATGCGCTTCTGACGCGTGGCTTTGATGATTTCATTCTGGCACCG
 CATTGCGGCTATGCTGACTTTCCGGCAGCGTTGATTCGTGATTACACCGATCTGGAA
 ATTCTGGCAGAGACGGAAGAAGGGGATGCATATCTGTTTGCCAGTAAAGATAAGCGC
 ATTGCCTTTGTGACGGGCCATCCCGAATATGATGCGCAAACGCTGGCGCAGGAATTT
 TTCCGCGATGTGGAAGCCGGACTAGACCCGGATGTACCGTATAACTATTTCCCGCAC
 AATGATCCGCAAATAACACCGCGAGCGAGCTGGCGTAGTCACGGTAATTTACTGTTT
 ACCAACTGGCTCAACTATTACGTCTGCCAGATCACGCCATACGATCTACGGCACATG
 AATCCAACGCTGGATTAA

FIG. 2

ATGCCGATTCGTGTGCCGGACGAGCTACCCGCCGTCAATTTCTTGCGTGAAGAAAAC
 GTCTTTGTGATGACAACTTCTCGTGCGTCTGGTCAGGAAATTCGTCCACTTAAGGTT
 CTGATCCTTAACCTGATGCCGAAGAAGATTGAAACTGAAAATCAGTTTCTGCGCCTG
 CTTTCAAACCTCACCTTTGCAGGTCGATATTCAGCTGTTGCGCATCGATTCCCGTGAA
 TCGCGCAACACGCCCCGAGAGCATCTGAACAACTTCTACTGTAACCTTTGAAGATATT
 CAGGATCAGAACTTTGACGGTTTGATTGTAACTGGTGCGCCGCTGGGCCCTGGTGGAG
 TTTAATGATGTCGCTTACTGGCCGCAGATCAAACAGGTGCTGGAGTGGTCGAAAGAT
 CACGTCACCTCGACGCTGTTTGTCTGCTGGGCGGTACAGGCCGCGCTCAATATCCTC
 TACGGCATTCCCTAAGCAAACCTCGCACCGAAAACTCTCTGGCGTTTACGAGCATCAT
 ATTCTCCATCCTCATGCGCTTCTGACGCGTGGCTTTGATGATTTCATTCTGGCACCG
 CATTGCGCTATGCTGACTTTCCGGCAGCGTTGATTTCGTGATTACACCGATCTGGAA
 ATTCTGGCAGAGACGGAAGAAGGGGATGCATATCTGTTTGCCAGTAAAGATAAGCGC
 ATTGCCTTTGTGACGGGCCATCCCGAATATGATGCGCAAACGCTGGCGCAGGAATTT
 TTCCGCGATGTGGAAGCCGGACTAGACCCGGATGTACCGTATAACTATTTCCCGCAC
 AATGATCCGCAAAATACACCGCGAGCGAGCTGGCGTAGTCACGGTAATTTACTGTTT
 ACCAACTGGCTCAACTATTACGTCTACCAGAGCACGCTATACGATCTACGGCACATG
 AATCCAACGCTGGATTAA

FIG. 3

ATGCCGATTCGTGTGCCGGACGAGCTACCCGCCGTCAATTTCTTGCGTGAAGAAAAC
 GTCTTTGTGATGACAACTTCTCGTGCGTCTGGTCAGGAAATTCGTCCACTTAAGGTT
 CTGATCCTTAACCTGATGCCGAAGAAGATTGAAACTGAAAATCAGTTTCTGCGCCTG
 CTTTCAAACCTCACCTTTGGAGGTCGATATTCAGCTGTTGCGCATCGATTCCCGTGAA
 TCGCGCAACACGCCCCGAGAGCATCTGAACAACTTCTACTGTAACCTTTGAAGATATT
 CAGGATCAGAACTTTGACGGTTTGATTGTAACTGGTGCGCCGCTGGGCCCTGGTGGAG
 TTTAATGATGTCGCTTACTGGCCGCAGATCAAACAGGTGCTGGAGTGGTCGAAAGAT
 CACGTCACCTCGACGCTGTTTGTCTGCTGGGCGGTACAGGCCGCGCTCAATATCCTC
 TACGGCATTCCCTAAGCAAACCTCGCACCGAAAACTCTCTGGCGTTTACGAGCATCAT
 ATTCTCCATCCTCATGCGCTTCTGACGCGTGGCTTTGATGATTTCATTCTGGCACCG
 CATTGCGCTATGCTGACTTTCCGGCAGCGTTGATTTCGTGATTACACCGATCTGGAA
 ATTCTGGCAGAGACGGAAGAAGGGGATGCATATCTGTTTGCCAGTAAAGATAAGCGC
 ATTGCCTTTGTGACGGGCCATCCCGAATATGATGCGCAAACGCTGGCGCAGGAATTT
 TTCCGCGATGTGGAAGCCGGACTAGACCCGGATGTACCGTATAACTATTTCCCGCAC
 AATGATCCGCAAAATACACCGCGAGCGAGCTGGCGTAGTCACGGTAATTTACTGTTT
 ACCAACTGGCTCAACTATTACGTCTACCAGATCACGCCATACGATCTACGGCACATG
 AATCCAACGCTGGATTAA

FIG. 4

ATGGCAAACACCTTTTTACGTCCGAGTCCGTCTCTGAAGGGCATCCTGACAAAATT
 GCTGACCAAATTTCTGATGCCGTTTTAGACGCGATCCTCGAACAGGATCCGAAAGCA
 CGCGTTGCTTGCGAAACCTACGTAAAAACCGGCATGGTTTTAGTTGGCGGCGAAATC
 ACCACCAGCGCCTGGGTAGACATCGAAGAGATCACCCGTAACACCGTTTCGCGAAATT
 GGCTATGTGCATTCCGACATGGGCTTTGACGCTAACTCCTGTGCGGTTCTGAGCGCT
 ATCGGCAAACAGTCTCCTGACATCAACCAGGGCGTTGACCGTGCCGATCCGCTGGAA
 CAGGGCGCGGGTGACCAGGGTCTGATGTTGGCTACGCAACTAATGAAACCGACGTG
 CTGATGCCAGCACCTATCACCTATGCACACCGTCTGGTACAGCGTCAGGCTGAAGTG
 CGTAAAAACGGCACTCTGCCGTGGCTGCGCCCGGACGCGAAAAGCCAGGTGACTTTT
 CAGTATGACGACGGCAAAATCGTTGGTATCGATGCTGTCGAGCTTTCCACTCAGCAC
 TCTGAAGAGATCGACCAGAAATCGCTGCAAGAAGCGGTAATGGAAGAGATCATCAAG
 CCAATTCTGCCCCGCTGAATGGCTGACTTCTGCCACCAAATTCTTCATCAACCCGACC
 GGTCGTTTTCTTATCGGTGGCCCAATGGGTGACTGCGGTCTGACTGGTCGTAAAATT
 ATCGTTGATACCTACGGCGGCATGGCGCGTCAACGGTGGCGGTGCATTCTCTGGTAAA
 GATCCATCAAAAGTGACCGTTCCGCAGCCTACGCAGCACGTTATGTGCGGAAAAAC
 ATCGTTGCTGCTGGCCTGGCCGATCGTTGTGAAATTCAGGTTTCCTACGCAATCGGC
 GTGGCTGAACCGACCTCCATCATGGTAGAACTTTCGGTACTGAGAAAGTGCCTTCT
 GAACAACTGACCCTGCTGGTACGTGAGTTCTTCGACCTGCGCCCATACGGTCTGATT
 CAGATGCTGGATCTGCTGCACCCGATCTACAAAGAAACCGCAGCATAACGGTCACTTT
 GGTCGTGAACATTTCCCGTGGGAAAAAACCGACAAAGCGCAGCTGCTGCGCGATGCT
 GCCGGTCTGAAGTAA

FIG. 5

ATGGCAAACACCTTTTTACGTCCGAGTCCGTCTCTGAAGGGCATCCTGACAAAATT
 GCTGACCAAATTTCTGATGCCGTTTTAGACGCGATCCTCGAACAGGATCCGAAAGCA
 CGCGTTGCTTGCGAAACCTACGTAAAAACCGGCATGGTTTTAGTTGGCGGCGAAATC
 ACCACCAGCGCCTGGGTAGACATCGAAGAGATCACCCGTAACACCGTTTCGCGAAATT
 GGCTATGTGCATTCCGACATGGGCTTTGACGCTAACTCCTGTGCGGTTCTGAGCGCT
 ATCGGCAAACAGTCTCCTGACATCAACCAGGGCGTTGACCGTGCCGATCCGCTGGAA
 CAGGGCGCGGGTGACCAGGGTCTGATGTTGGCTACGCAACTAATGAAACCGACGTG
 CTGATGCCAGCACCTATCACCTATGCACACCGTCTGGTACAGCGTCAGGCTGAAGTG
 CGTAAAAACGGCACTCTGCCGTGGCTGCGCCCGGACGCGAAAAGCCAGGTGACTTTT
 CAGTATGACGACGGCAAAATCGTTGGTATCGATGCTGTCGTGCTTTCCACTCAGCAC
 TCTGAAGAGATCGACCAGAAATCGCTGCAAGAAGCGGTAATGGAAGAGATCATCAAG
 CCAATTCTGCCCCGCTGAATGGCTGACTTCTGCCACCAAATTCTTCATCAACCCGACC
 GGTCGTTTTCTTATCGGTGGCCCAATGGGTGACTGCGGTCTGACTGGTCGTAAAATT
 ATCGTTGATACCTACGGCGGCATGGCGCGTCAACGGTGGCGGTGCATTCTCTGGTAAA
 GATCCATCAAAAGTGACCGTTCCGCAGCCTACGCAGCACGTTATGTGCGGAAAAAC
 ATCGTTGCTGCTGGCCTGGCCGATCGTTGTGAAATTCAGGTTTCCTACGCAATCGGC
 GTGGCTGAACCGACCTCCATCATGGTAGAACTTTCGGTACTGAGAAAGTGCCTTCT
 GAACAACTGACCCTGCTGGTACGTGAGTTCTTCGACCTGCGCCCATACGGTCTGATT
 CAGATGCTGGATCTGCTGCACCCGATCTACAAAGAAACCGCAGCATAACGGTCACTTT
 GGTCGTGAACATTTCCCGTGGGAAAAAACCGACAAAGCGCAGCTGCTGGCGATGCTG
 CCGGTCTGAAGTAA

FIG. 6

MPIRVPDELPAVNFLREENVFVMTTSRASGQEIRPLKVLILNLMPPKKIETENQFLRL
LSNSPLQVDIQLLRIDSRESRNTPAEHLNNFYCNFEDIQDQNF DGLIVTGAPLGLVE
FNDVAYWFPQIKQVLEWSKDHVTSTLFVCWAVQAALNILYGIPKQTRTEKLSGVYEH
ILHPHALLTRGFDDSF LAHSRYADFP AALIRDYTDLEILAETEEGDAYLFASKDKRI
AFVTGHPEYDAQTLAQEFFRDVEAGLDPDPYNYFPHNDPQNTPRASWRSHGNLLFT
NWLNYVYVYQITPYDLRHMNP TLD

FIG. 7A

ATGCCGATTCGTGTGCCGGACGAGCTACCCGCCGTCAATTTCTTGCGTGAAGAAAAC
GTCTTTGTGATGACAACTTCTTGTGCGTCTGGTCAGGAAATTCGTCCACTTAAGGTT
CTGATCCTTAACCTGATGCCGAAGAAGATTGAAACTGAAAATCAGTTTCTGCGCCTG
CTTTCAAACTCACCTTTGCAGGTCGATATTCAGCTGTTGCGCATCGATTCCCGTGAA
TCGCGCAACACGCCCGCAGAGCATCTGAACAACTTCTACTGTAAC TTTGAAGATATT
CAGGATCAGAACTTTGACGGTTTGATTGTAAC TGGTGCGCCGCTGGGCCTGGTGGAG
TTTAATGATGTCGCTTACTGGCCGCAGATCAAACAGGTGCTGGAGTGGTCGAAAGAT
CACGTCACCTCGACGCTGTTTGTCTGCTGGGCGGTACAGGCCGCGCTCAATATCCTC
TACGGCATTCCCTAAGCAAAC TCGCACCGAAAACTCTCTGGCGTTTACGAGCATCAT
ATTCTCCATCCTCATGCGCTTCTGACGCGTGGCTTTGATGATT CATTCCTGGCACCG
CATTCGCGCTATGCTGACTTTCCGGCAGCGTTGATTCTGTGATTACACCGATCTGGAA
ATTCTGGCAGAGACGGAAGAAGGGGATGCATATCTGTTTGCCAGTAAAGATAAGCGC
ATTGCCTTTGTGACGGGCCATCCCGAATATGATGCGCAAACGCTGGCGCAGGAATTT
TTCCGCGATGTGGAAGCCG GACTAGACCCGGATGTACCGTATAACTATTTCCCGCAC
AATGATCCGCAAAATACACCGCGAGCGAGCTGGCGTAGTCACGGTAATTTACTGTTT
ACCAACTGGCTCAACTATTACGTCTACCAGATCACGCCATACGATCTACGGCACATG
AATCCAACGCTGGATTAA

FIG. 7B

MAKHLFTSESVSEGHDPDKIADQISDAVLDAILEQDPKARVACETYVKTGMVLVGGEI
TTSWVDIEEITRNTVREIGYVHSDMGFDANSCAVLSAIGKQSPDINQGVDRADPLE
QGAGDOGLMFGYATNETDVLMPAPITYAHLVQRQAEVRKNGTLPWLRPDAKSQVTF
QYDDGKIVGIDAVVLSTQHSEEIDQKSLQEAVMEEIIKPILPAEWLTSATKFFINPT
GRFVIGGPMGDCGLTGRKIIIVDTYGGMARHGGGAFSGKDPSKVDRSAAYAARYVAKN
IVAAGLADRCEIQVSYAIGVAEPTSIMVETFGTEKVPSEQLTLLVREFFDLRPYGLI
QMLDLLHPIYKETAAYGHFGREHFPWEKTDKAQLLRDAAGLK

FIG. 8A

ATGGCAAACACCTTTTTACGTCCGAGTCCGTCTCTGAAGGGCATCCTGACAAAATT
GCTGACCAAATTTCTGATGCCGTTTTAGACGCGATCCTCGAACAGGATCCGAAAGCA
CGCGTTGCTTGCGAAACCTACGTAAAAACCGGCATGGTTTTAGTTGGCGGCGAAATC
ACCACCAGCGCCTGGGTAGACATCGAAGAGATCACCCGTAACACCGTTCTGCGAAATT
GGCTATGTGCATTCCGACATGGGCTTTGACGCTAACTCCTGTGCGGTTCTGAGCGCT
ATCGGCAAACAGTCTCCTGACATCAACCAGGGCGTTGACCGTGCCGATCCGCTGGAA
CAGGGCGCGGGTGACCAGGGTCTGATGTTTGGCTACGCAACTAATGAAACCGACGTG
CTGATGCCAGCACCTATCACCTATGCACACCGTCTGGTACAGCGTCAGGCTGAAGTG
CGTAAAAACGGCACTCTGCCGTGGCTGCGCCCGGACGCGAAAAGCCAGGTGACTTTT
CAGTATGACGACGGCAAATCGTTGGTATCGATGCTGTCGTGCTTTCCACTCAGCAC
TCTGAAGAGATCGACCAGAAATCGCTGCAAGAAGCGGTAATGGAAGAGATCATCAAG
CCAATTCTGCCCGCTGAATGGCTGACTTCTGCCACCAAATTCTTCATCAACCCGACC
GGTCGTTTTCGTTATCGGTGGCCCAATGGGTGACTGCGGTCTGACTGGTCGTAAAATT
ATCGTTGATACCTACGGCGGCATGGCGCGTCACGGTGGCGGTGCATTCTCTGGTAAA
GATCCATCAAAAGTGGACCGTTCCGCAGCCTACGCAGCACGTTATGTCGCGAAAAAC
ATCGTTGCTGCTGGCCTGGCCGATCGTTGTGAAATTCAGGTTTCTACGCAATCGGC
GTGGCTGAACCGACCTCCATCATGGTAGAACTTTCGGTACTGAGAAAGTGCCTTCT
GAACAACTGACCCTGCTGGTACGTGAGTTCTTCGACCTGCGCCCATACGGTCTGATT
CAGATGCTGGATCTGCTGCACCCGATCTACAAAGAAACCGCAGCATACGGTCACTTT
GGTCGTGAACATTTCCCGTGGGAAAAAACCGACAAAGCGCAGCTGCTGCGCGATGCT
GCCGGTCTGAAGTAA

FIG. 8B

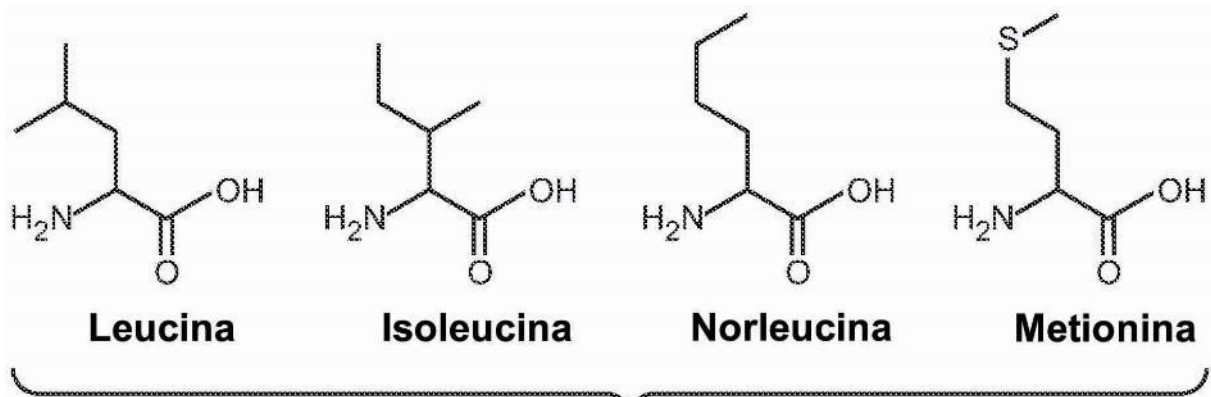


FIG. 9

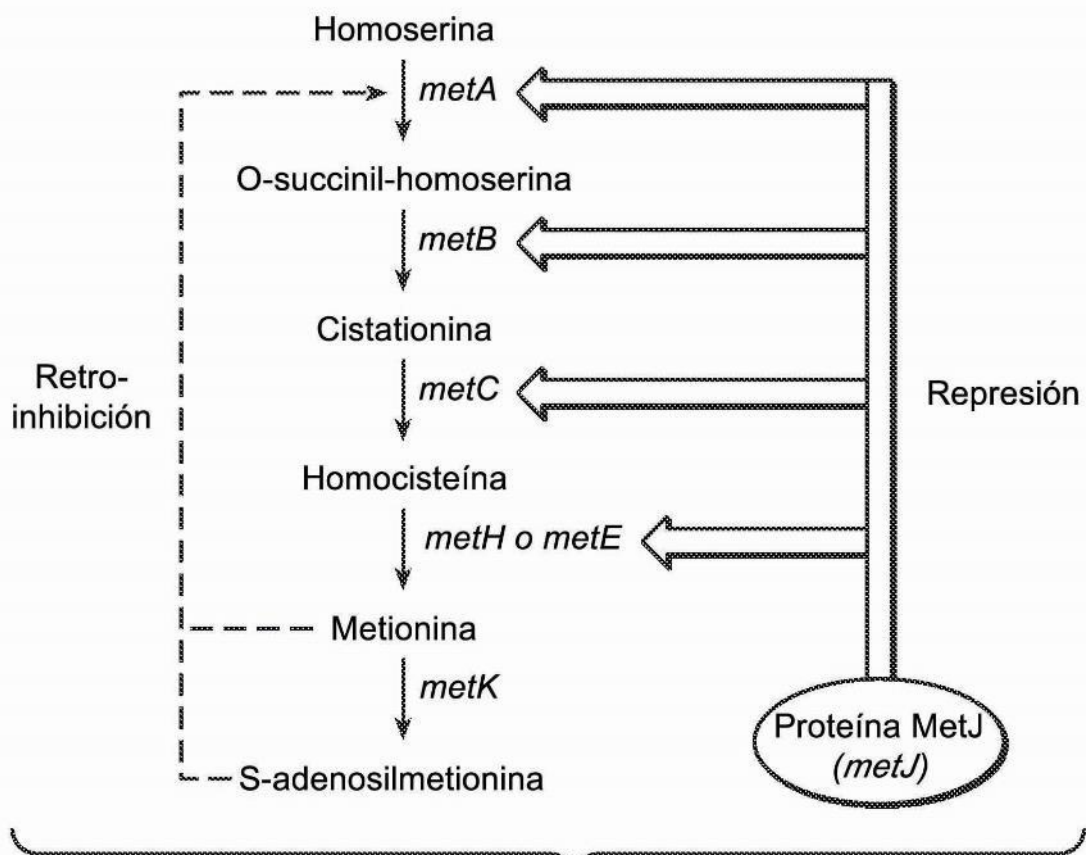
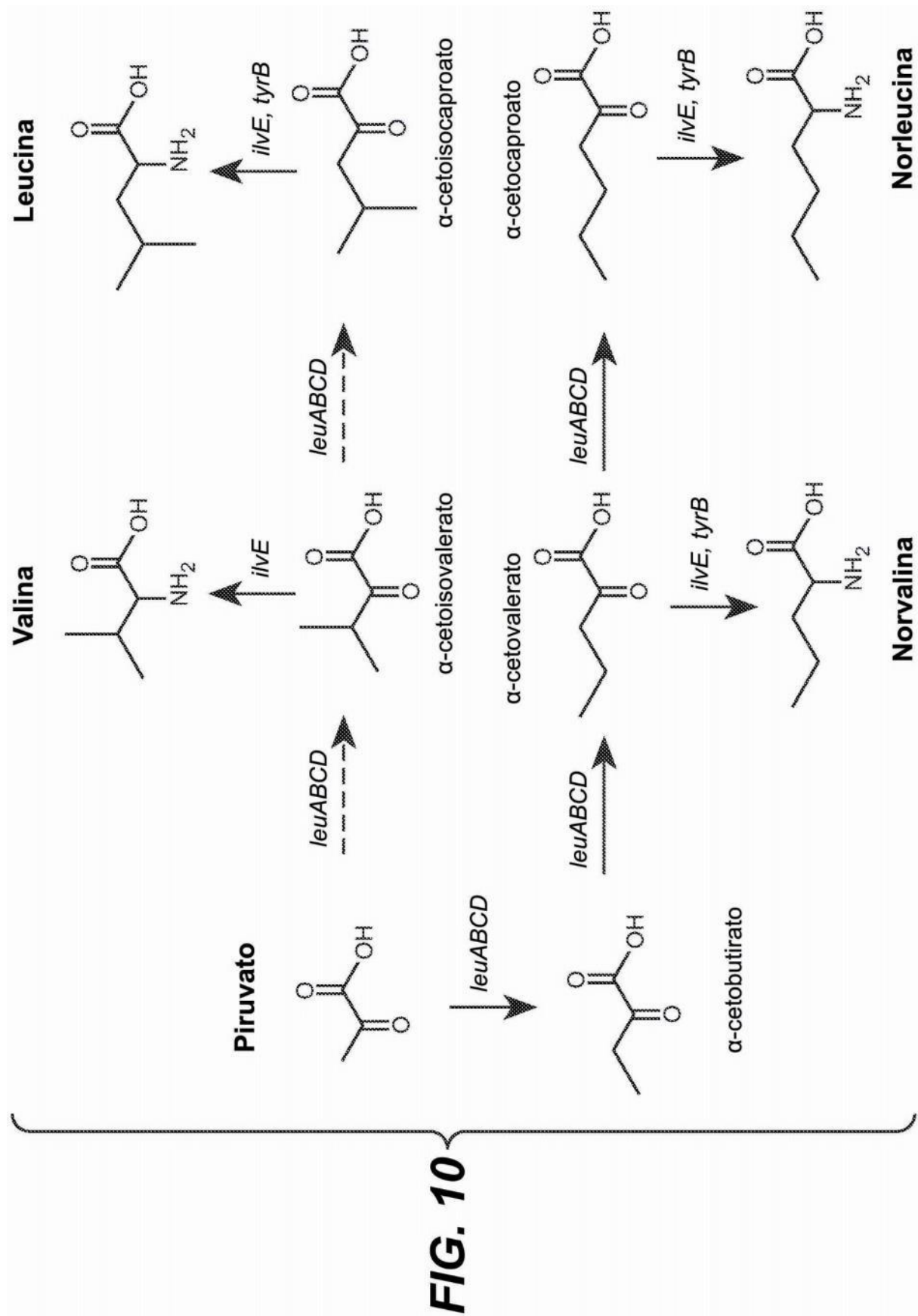
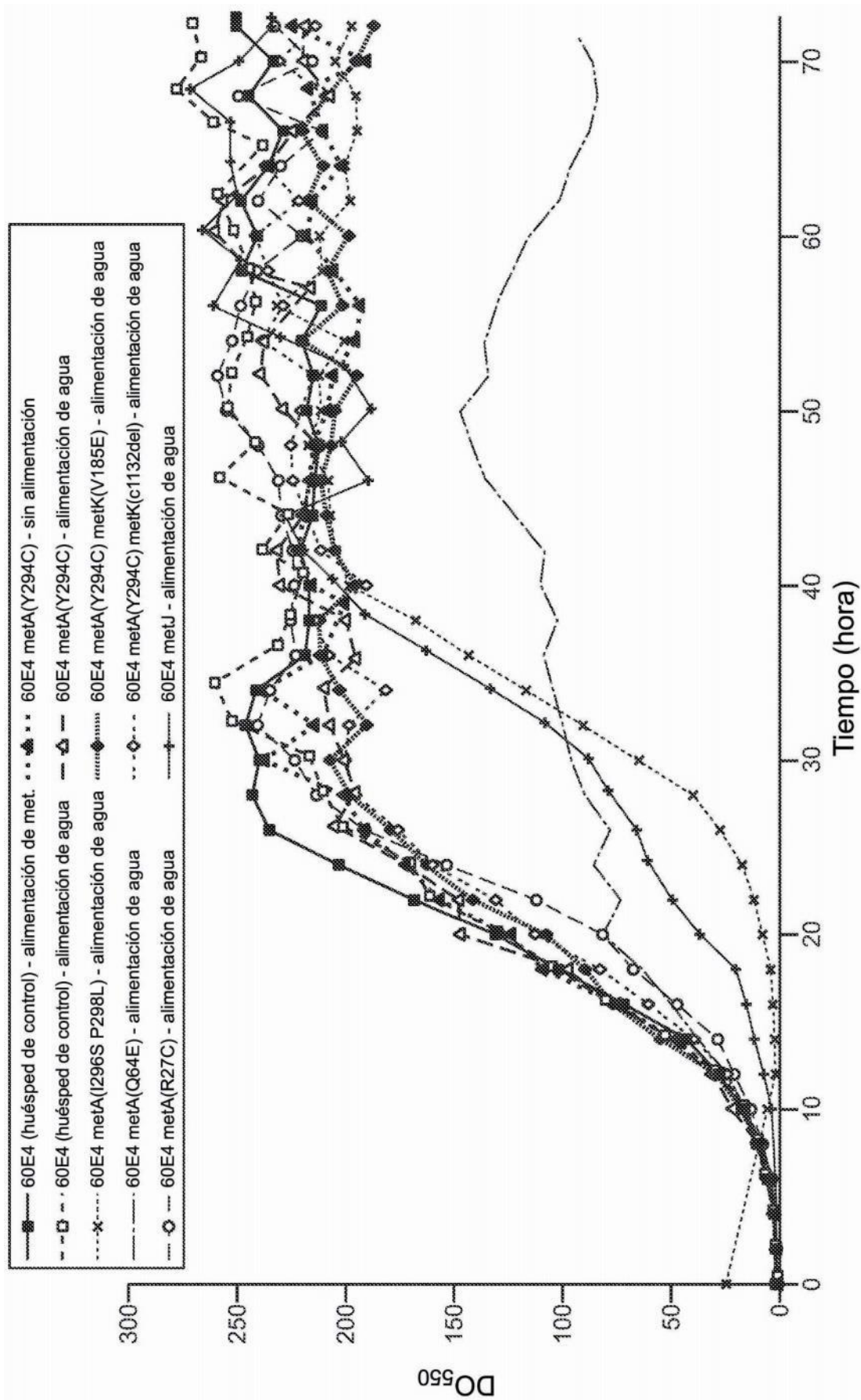


FIG. 11



**FIG. 12A**

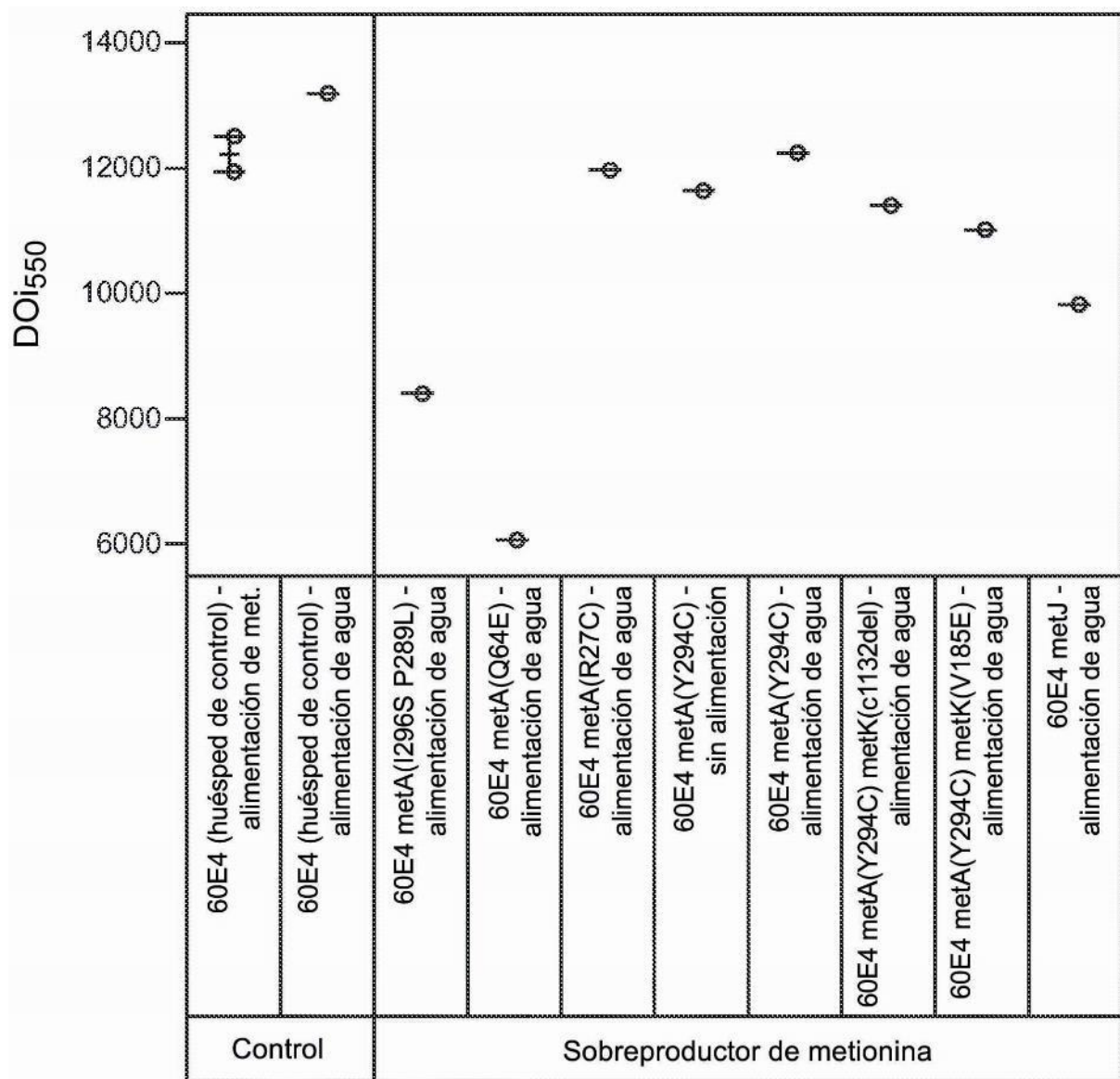
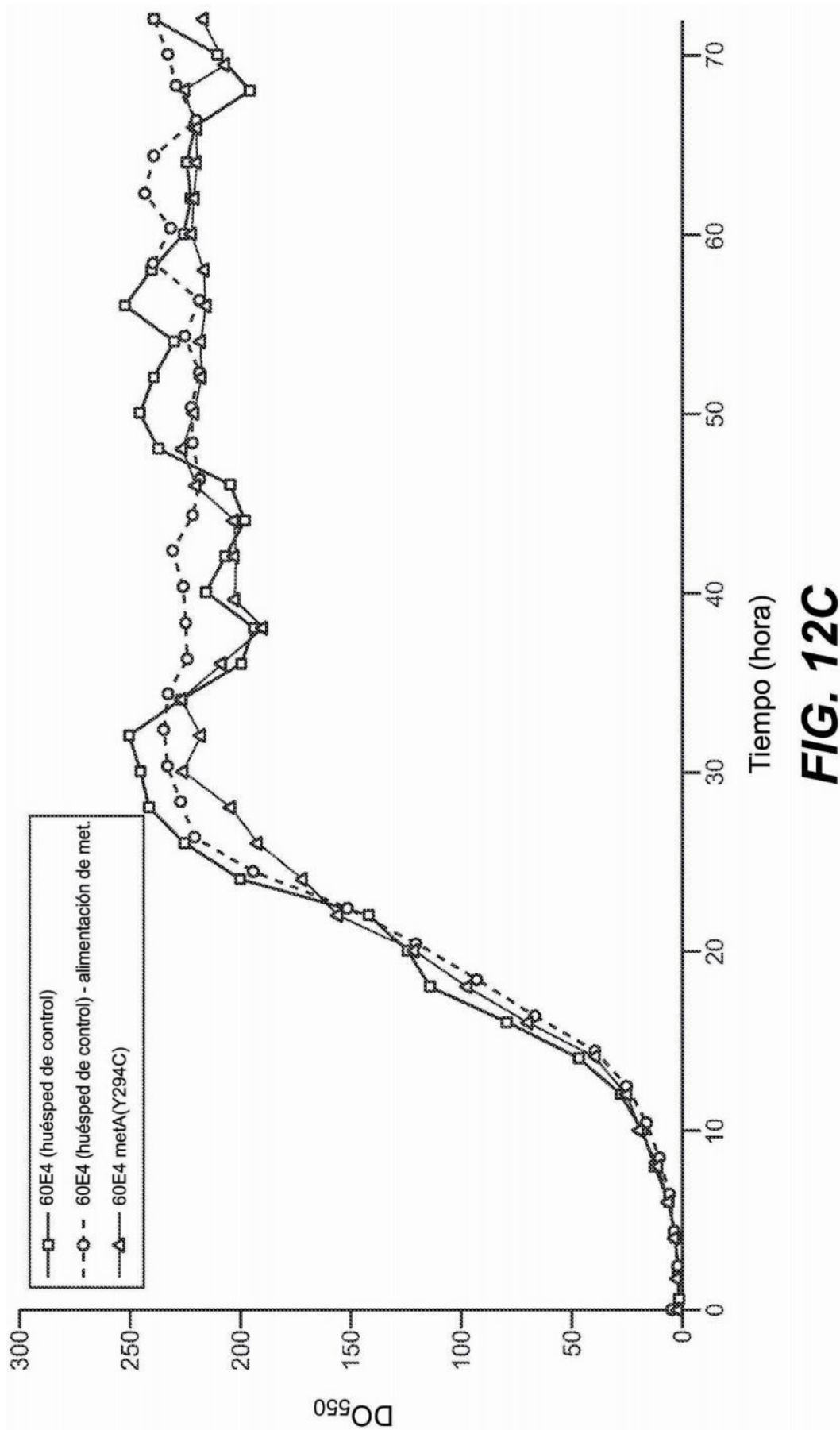


FIG. 12B



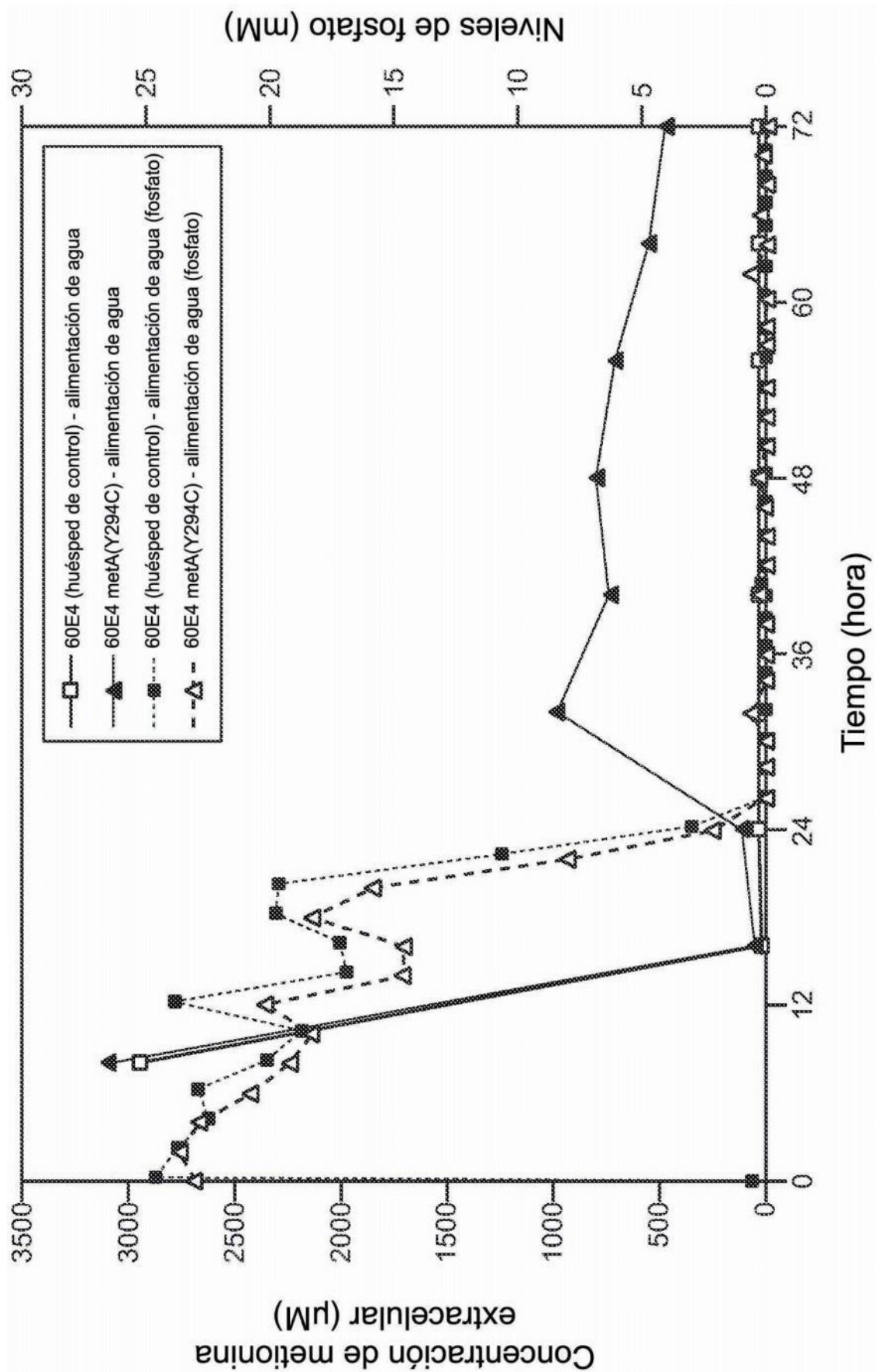


FIG. 13A

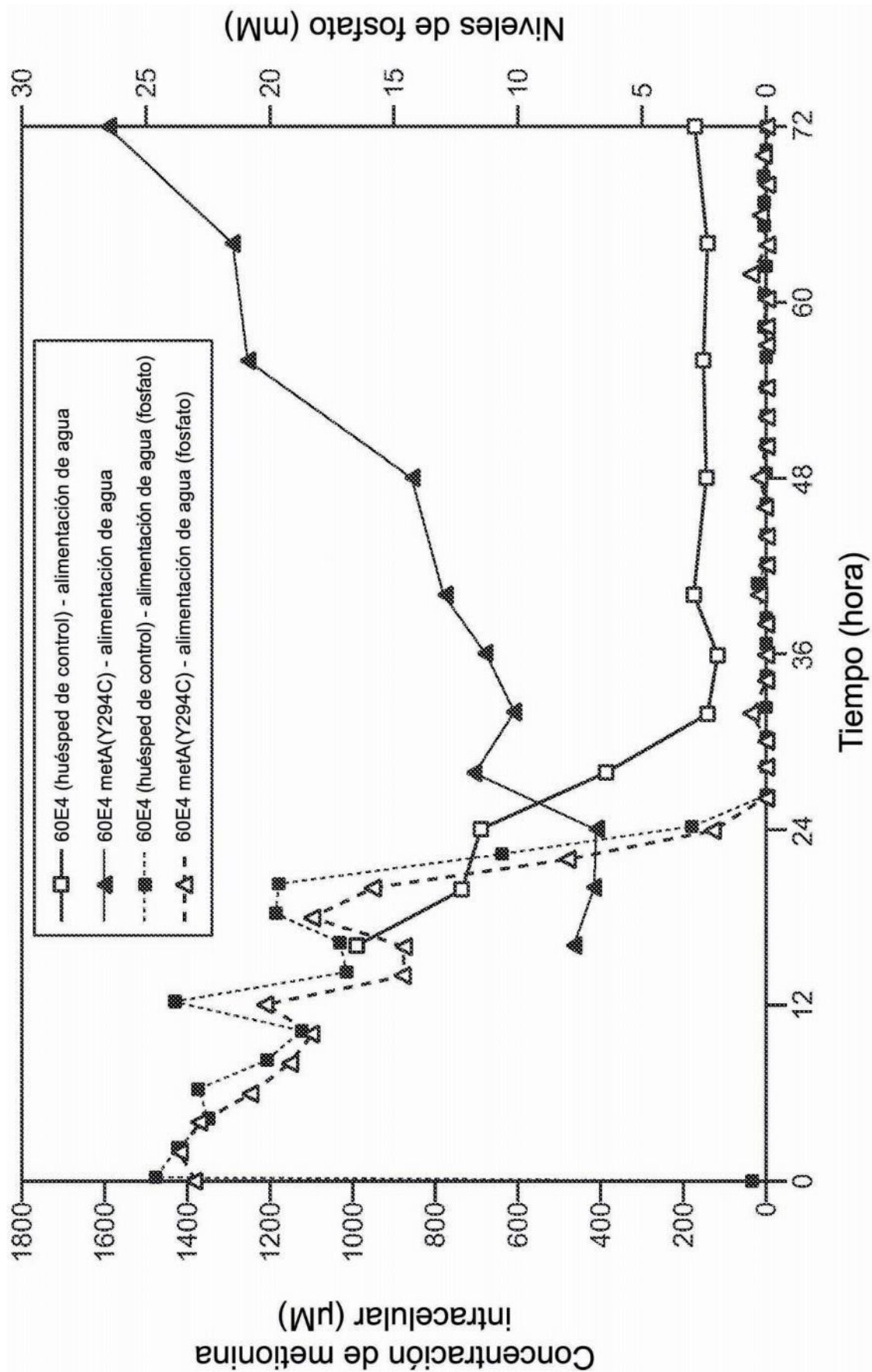
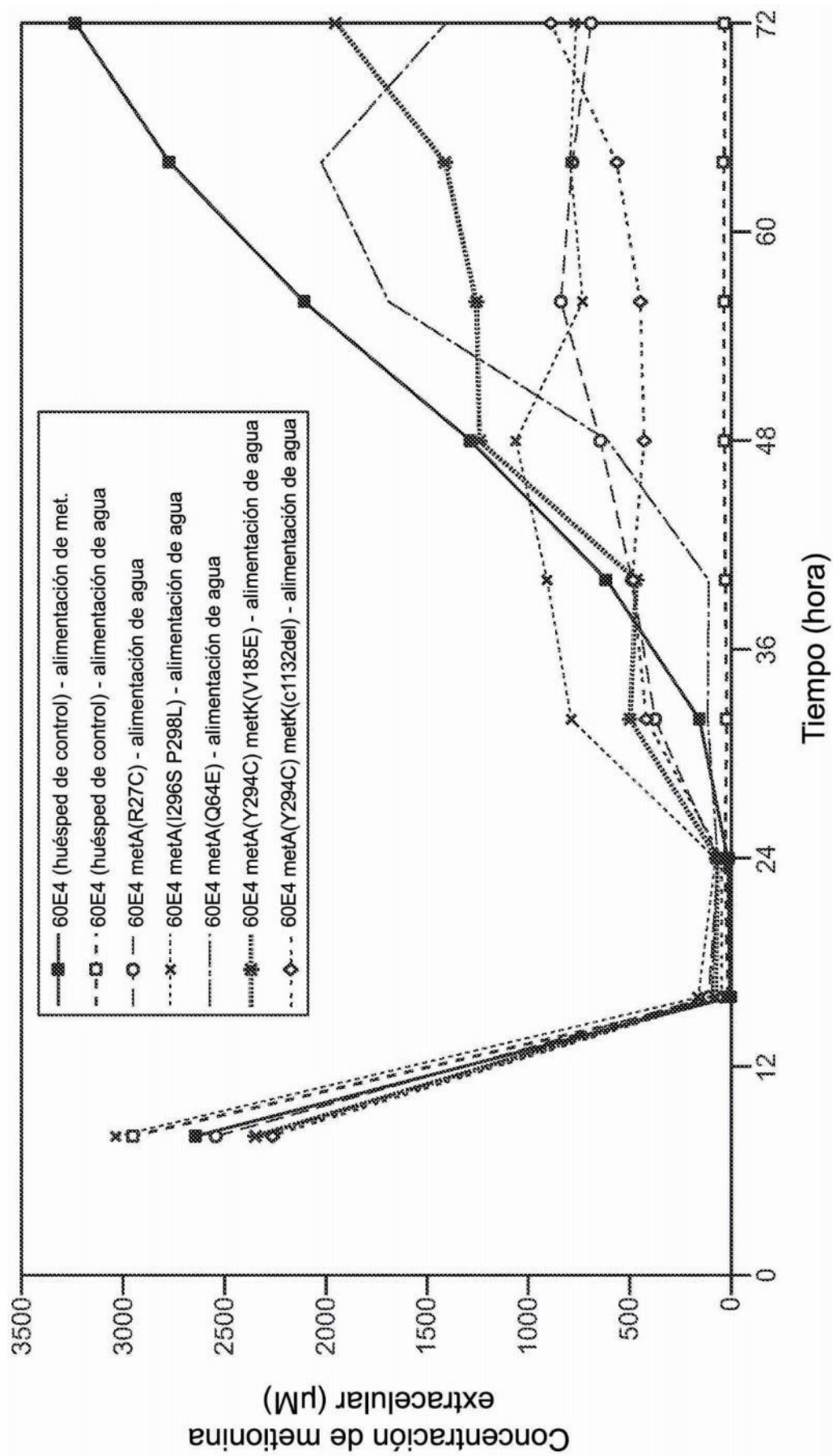


FIG. 13B

**FIG. 14A**

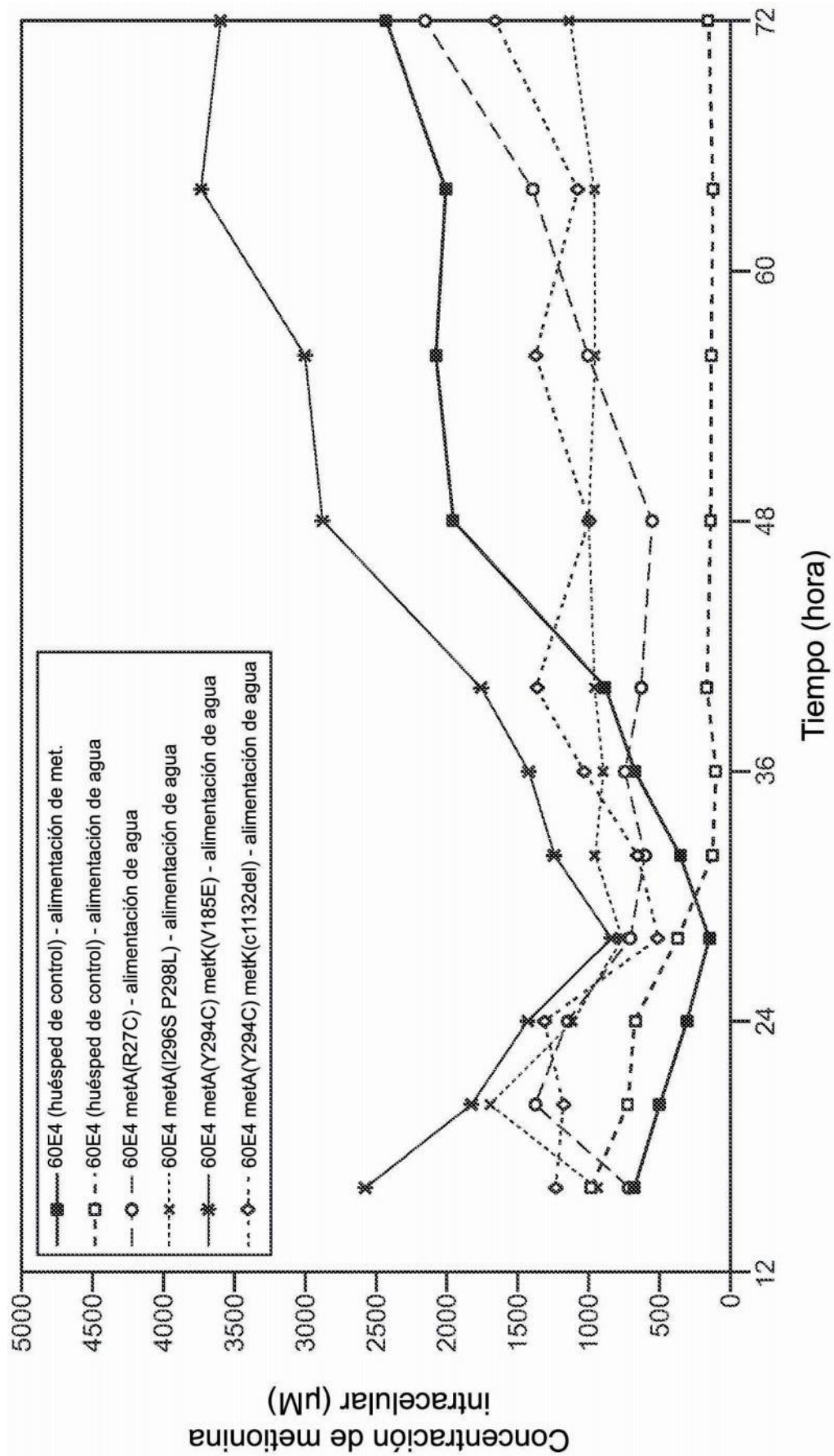
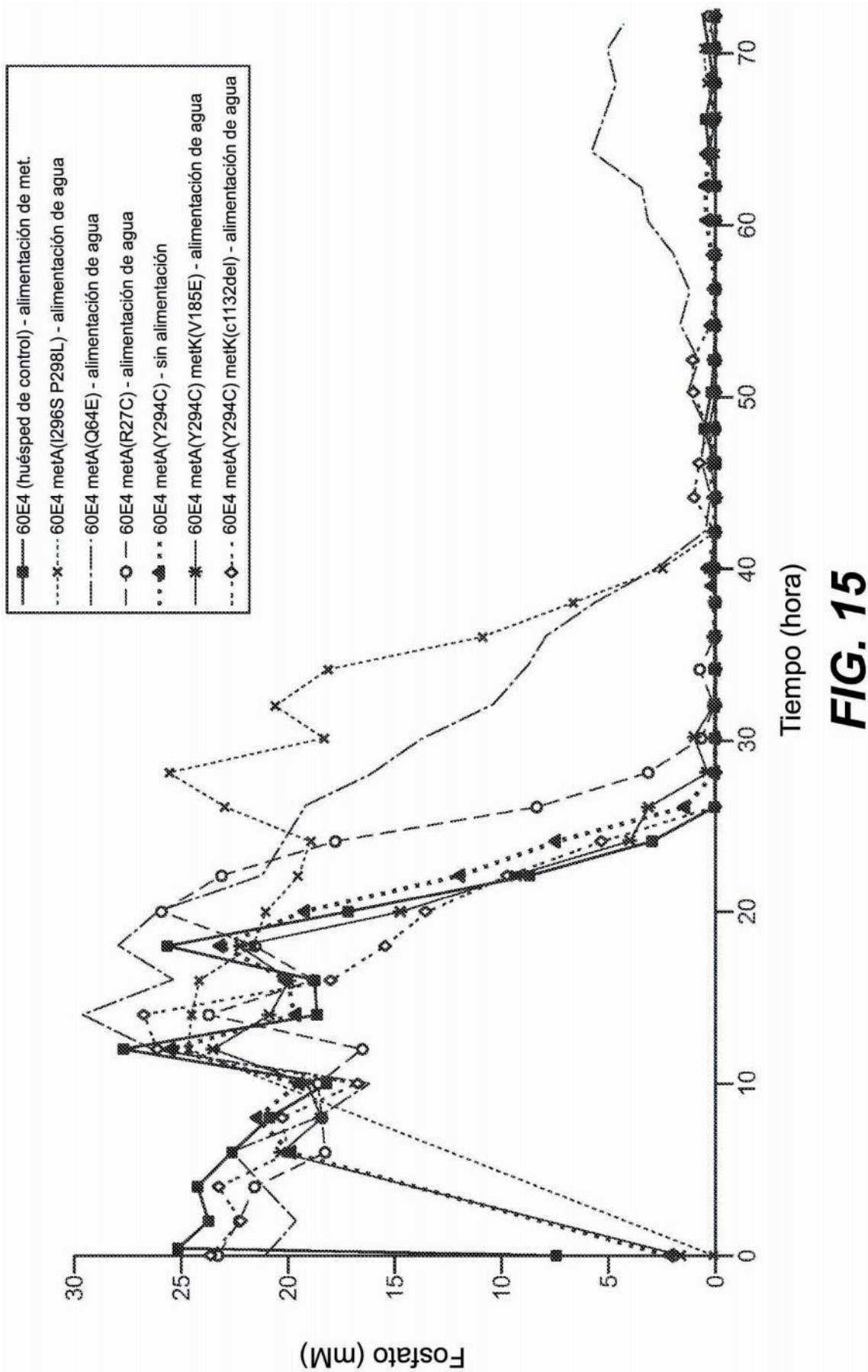


FIG. 14B



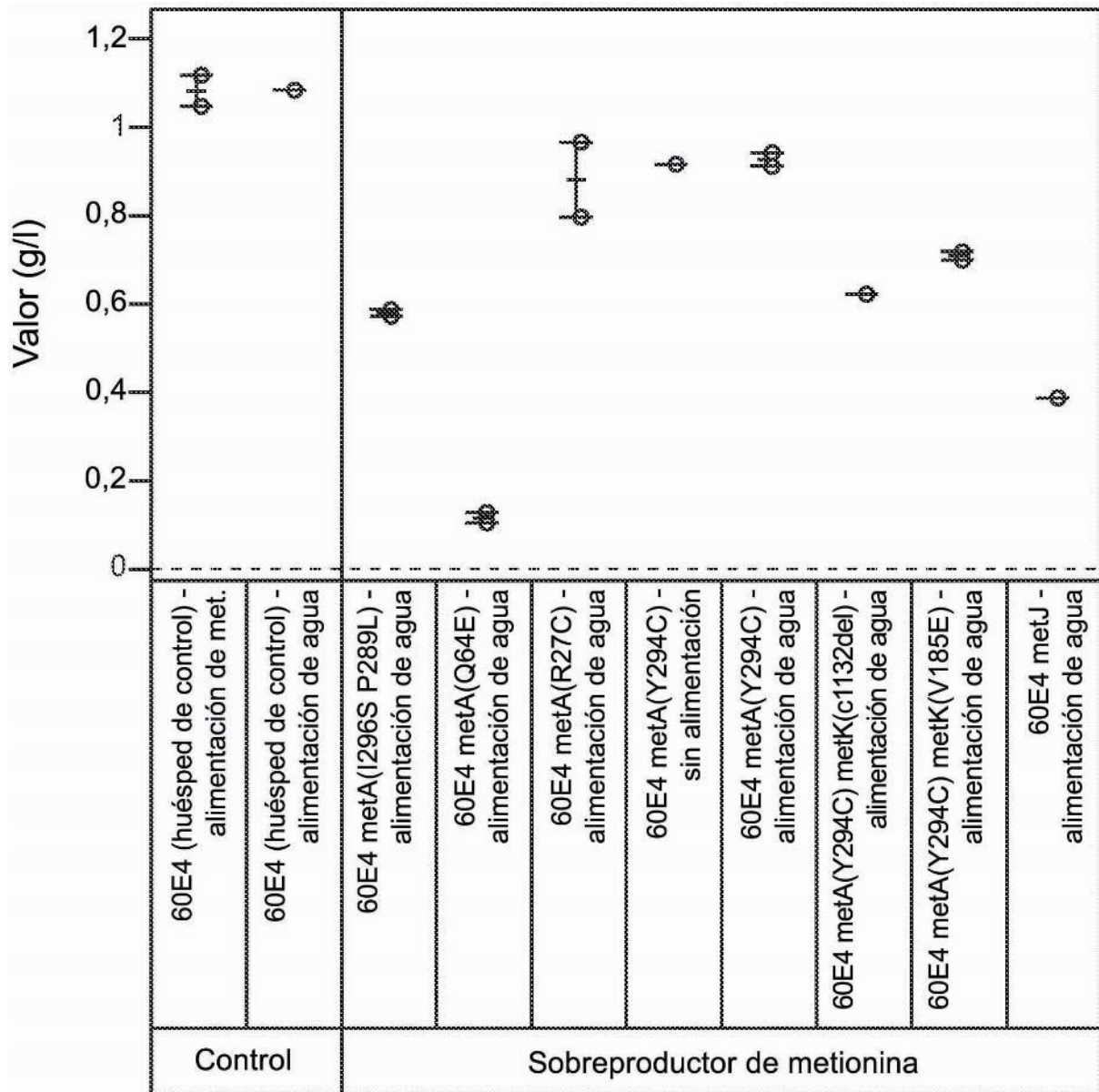
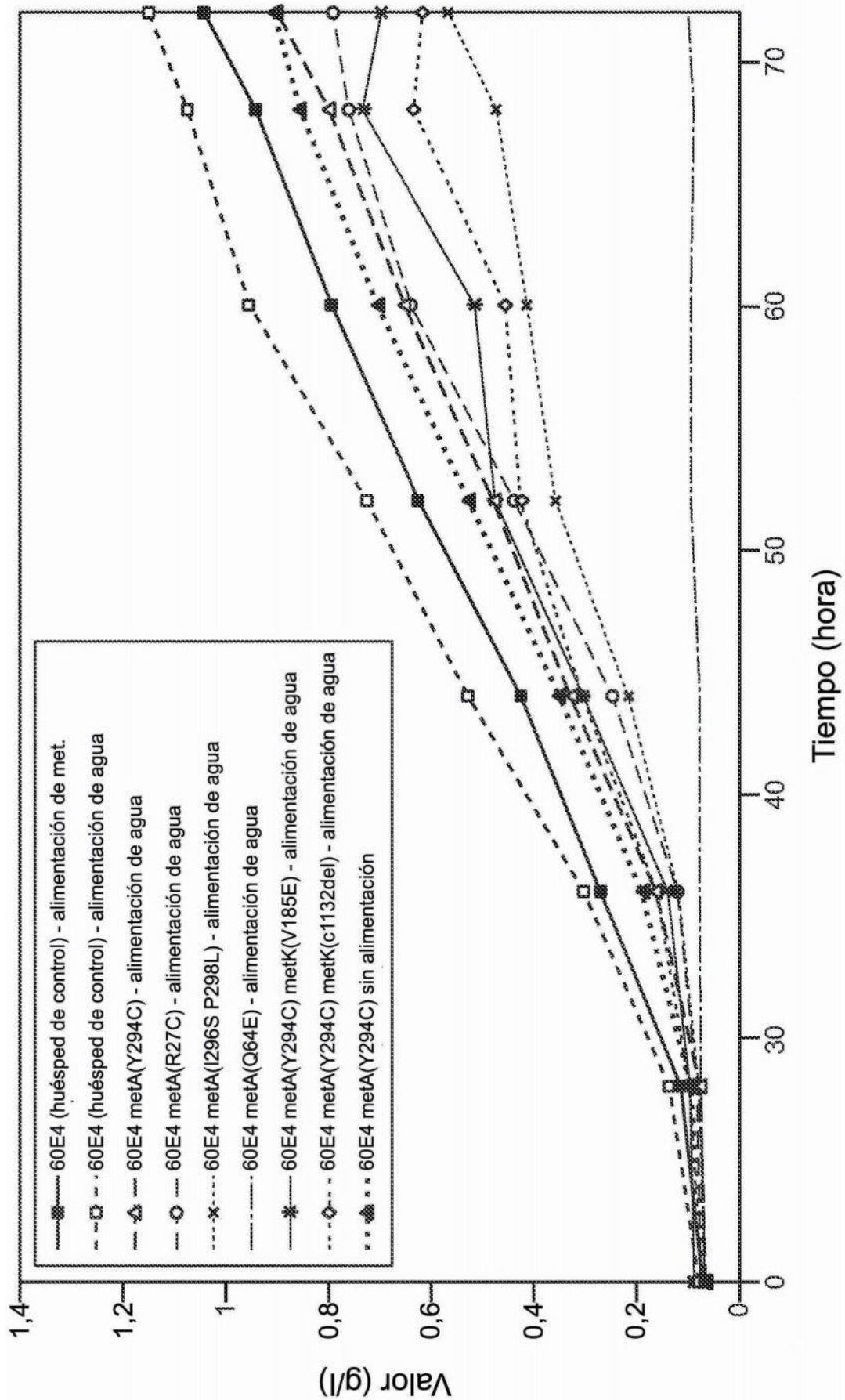


FIG. 16A

**FIG. 16B**

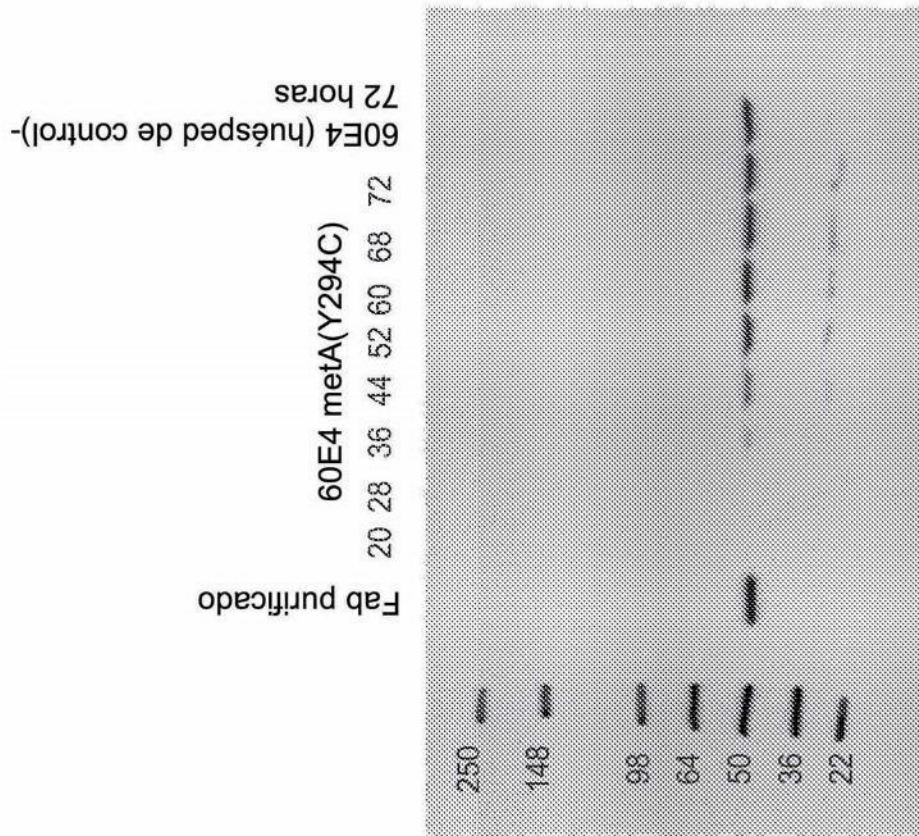


FIG. 17B

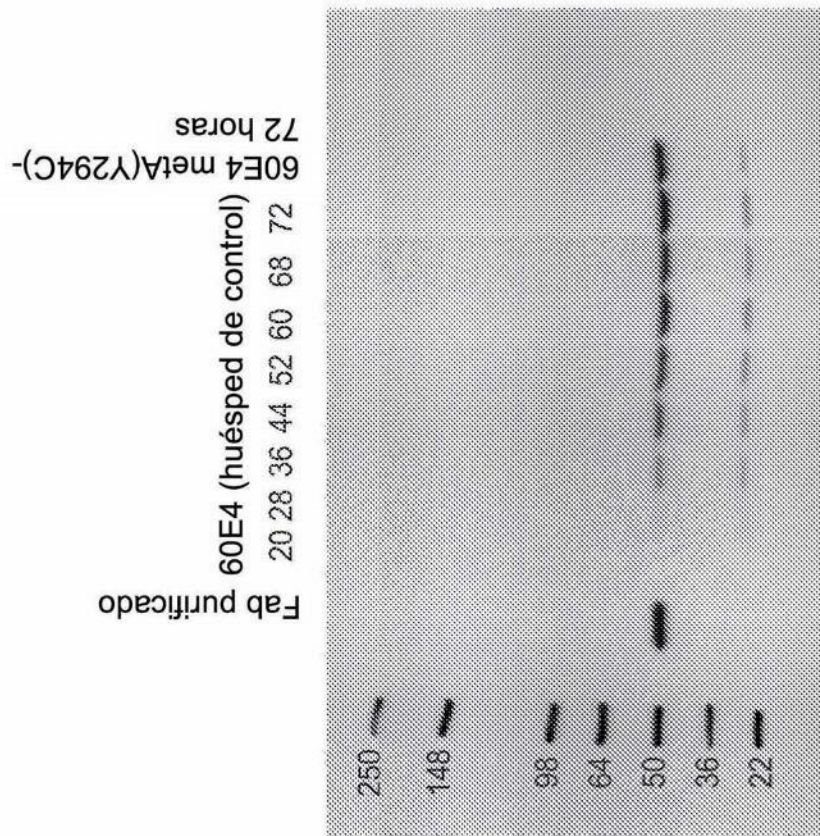


FIG. 17A

GATATCCAGTTGACCCAGTCCC
 CGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACCTGCAGCGCAAGTCAGG
 ATATTAGCAACTATTTAAACTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAAGTACTGA
 TTTACTTCACCTCCTCTCTCCACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATCCGGTTCTG
 GGACGGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTACT
 GTCAACAGTATAGCACCGTGCCGTGGACGTTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAAC
 GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
 GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACA
 GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
 AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAAGA
 GCTTCAACAGGGGAGAGTGT

FIG. 18A

GAGGTTC
 AGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGTG
 CAGCTTCTGGCTACGACTTCACGCCTACGGTATGAACTGGGTCCGTCAGGCCCCGGGTA
 AGGGCCTGGAATGGGTGGATGGATTAACACCTATACCGGTGAACCGACCTATGCTGCGG
 ATTTCAAACGTCGTTTCACTTTTTCTTTAGACACCTCCAAAAGCACAGCATACCTGCAGA
 TGAACAGCCTGCGCGCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCAAAGTACCCGTACTATT
 ATGGGACGAGCCACTGGTATTTTCGACGTCTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT
 CGGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTG
 GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
 CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCCT
 CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA
 CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTCGACAAGAAAGTTGAGC
 CCAATCTTGTGACAAAACCTCACCTC

FIG. 18B

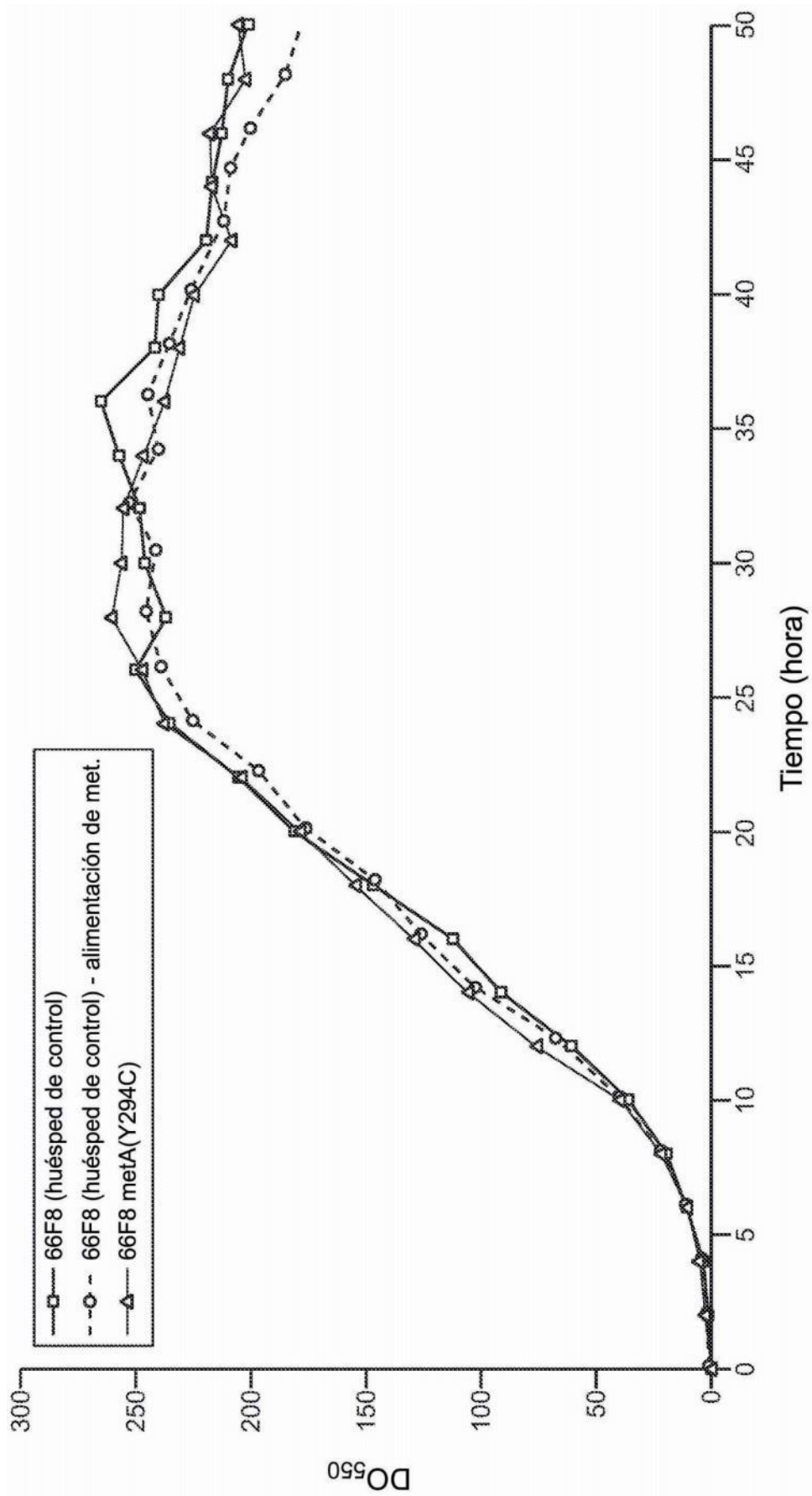


FIG. 19A

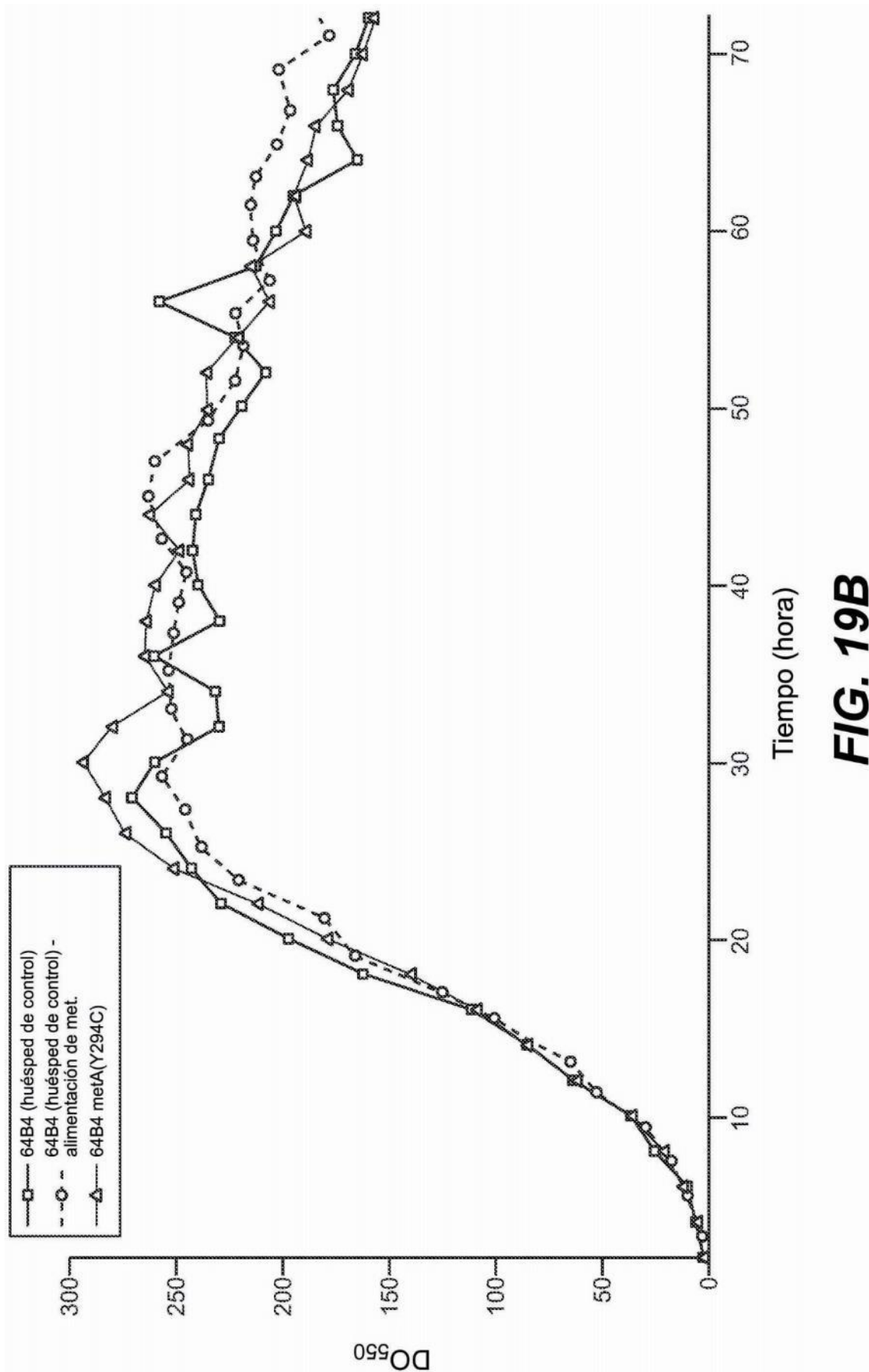
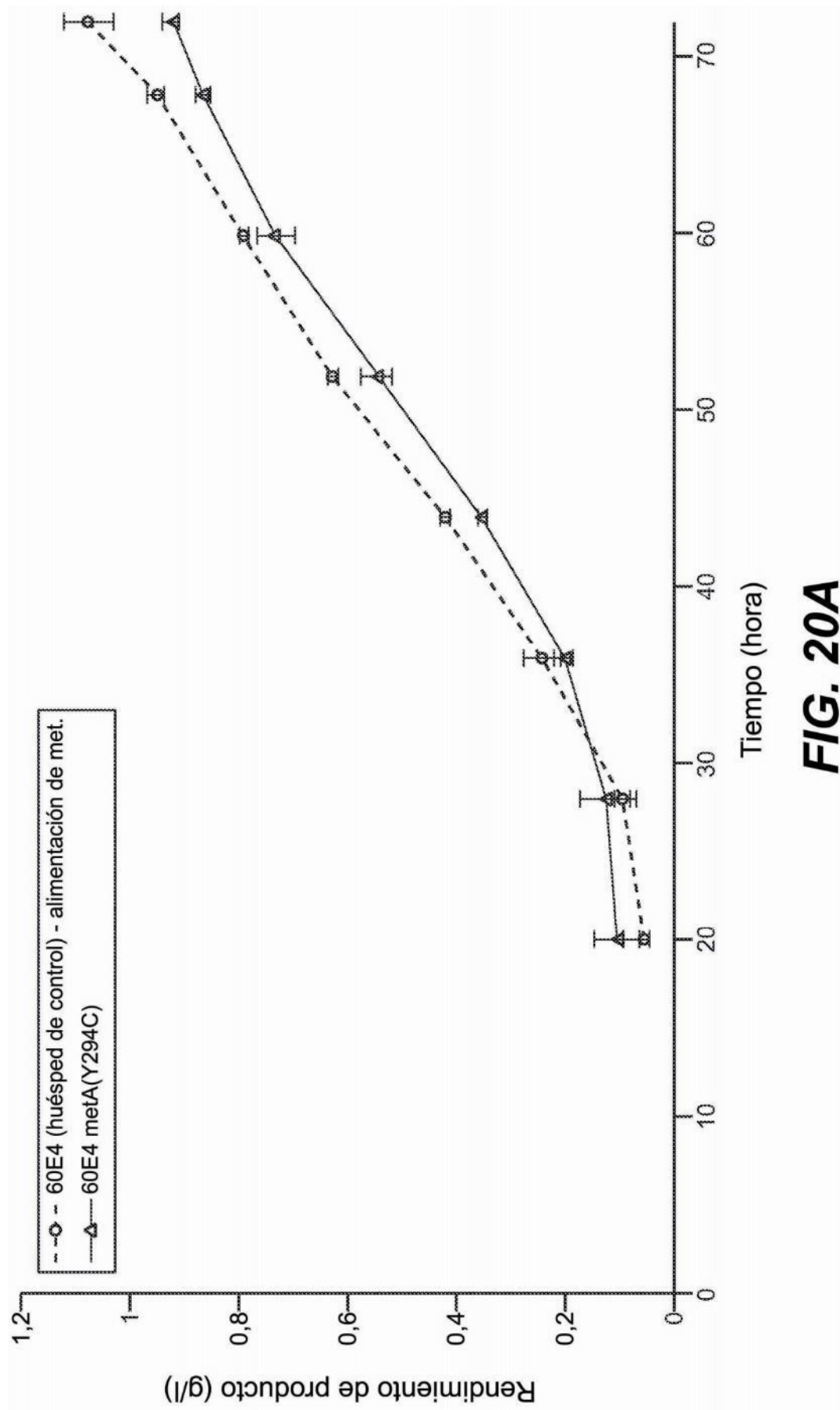
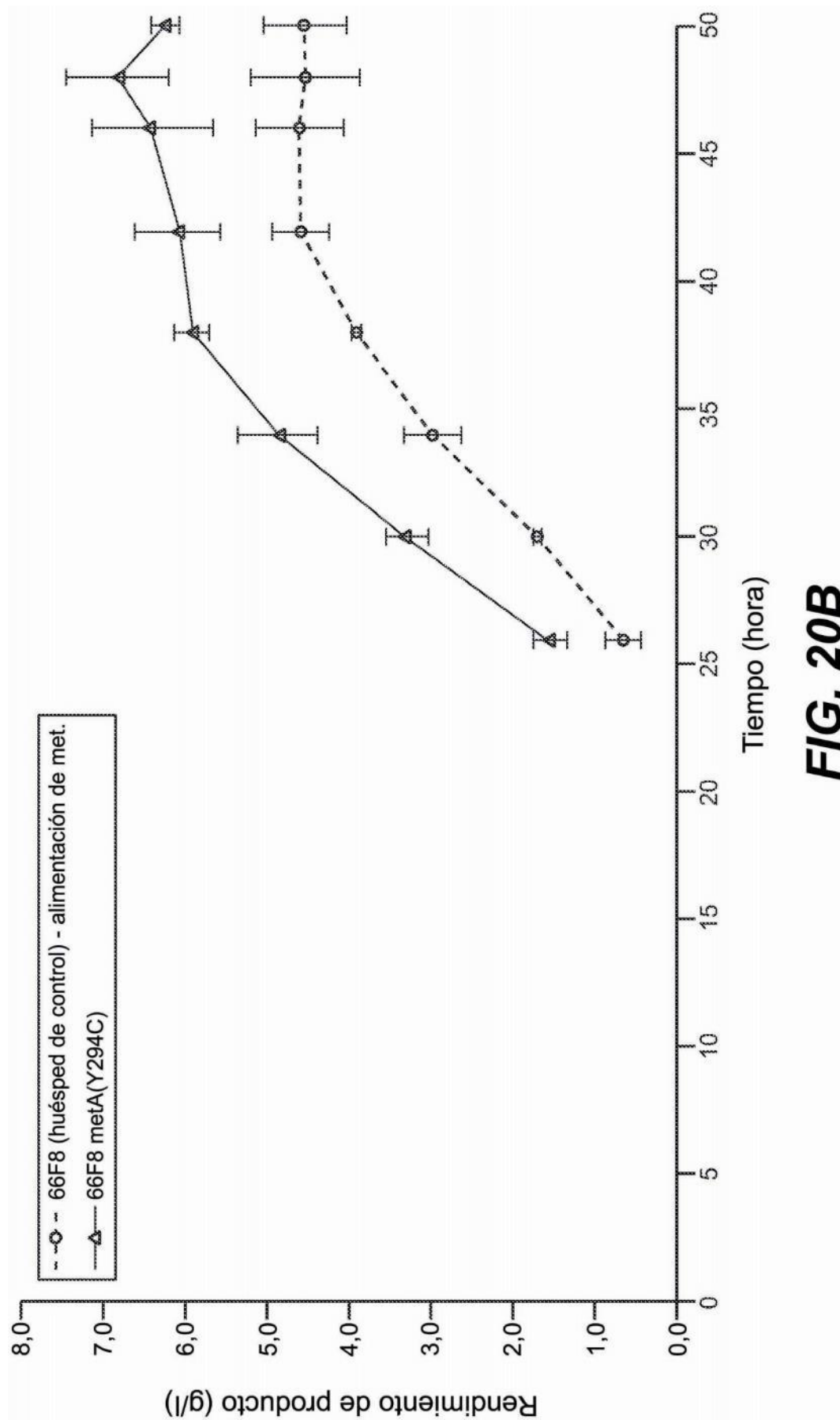


FIG. 19B



**FIG. 20B**

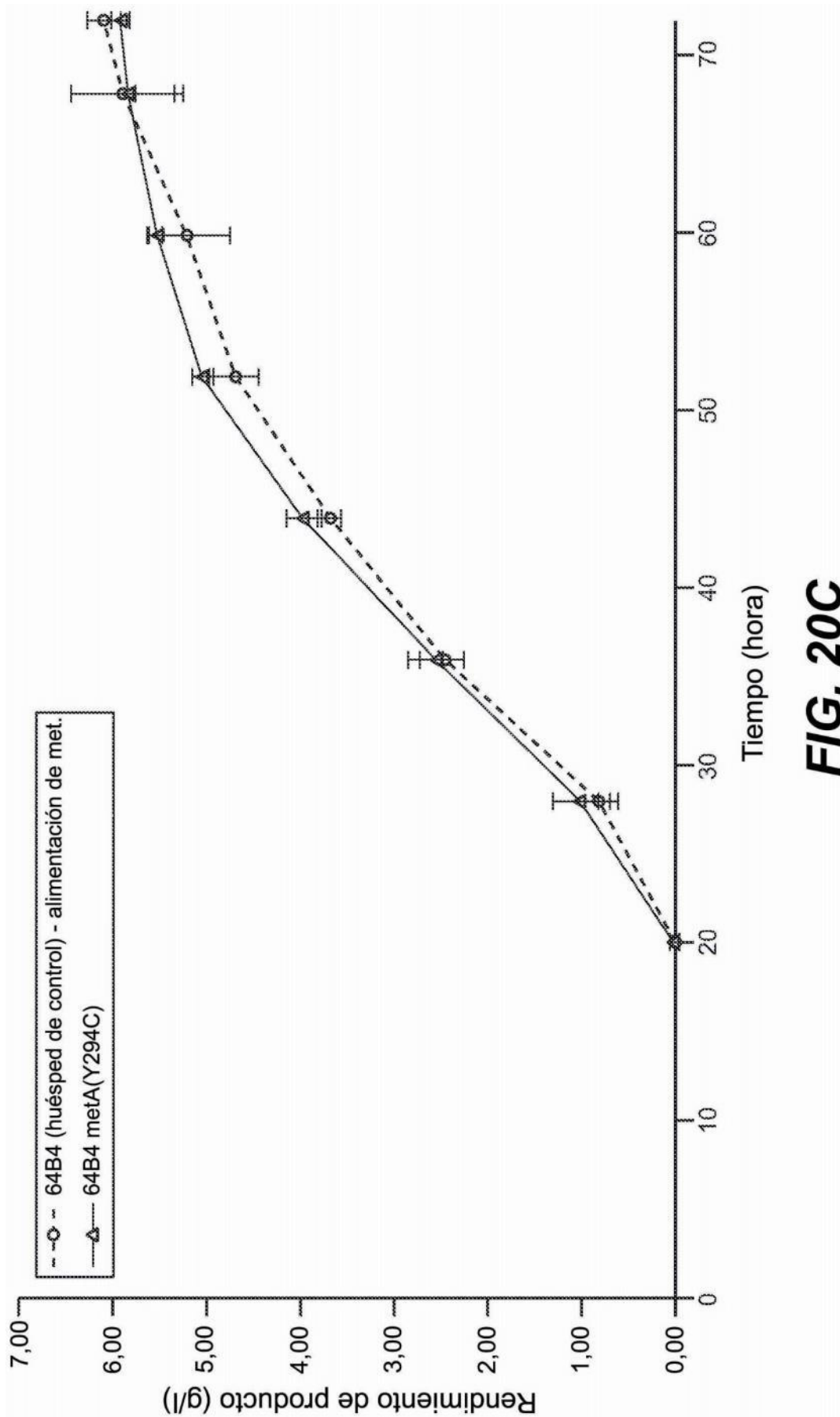


FIG. 20C

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTIISSLOPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 21A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTY
AADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL

FIG. 21B

DIQVTQSPSSLSASVGDRVTITCITSTDIDDDMNWYQQKPGKVPKLLISGGNTLRPGVPS
RFSGSGSGTDFTLTIISSLOPEDVATYYCQSDSLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 22A

EVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGETTY
ADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCEREKGVNNWGQGTLLVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

FIG. 22B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTR
ESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIISSLOPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 23A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSDTRF
NPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 23B

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 23C